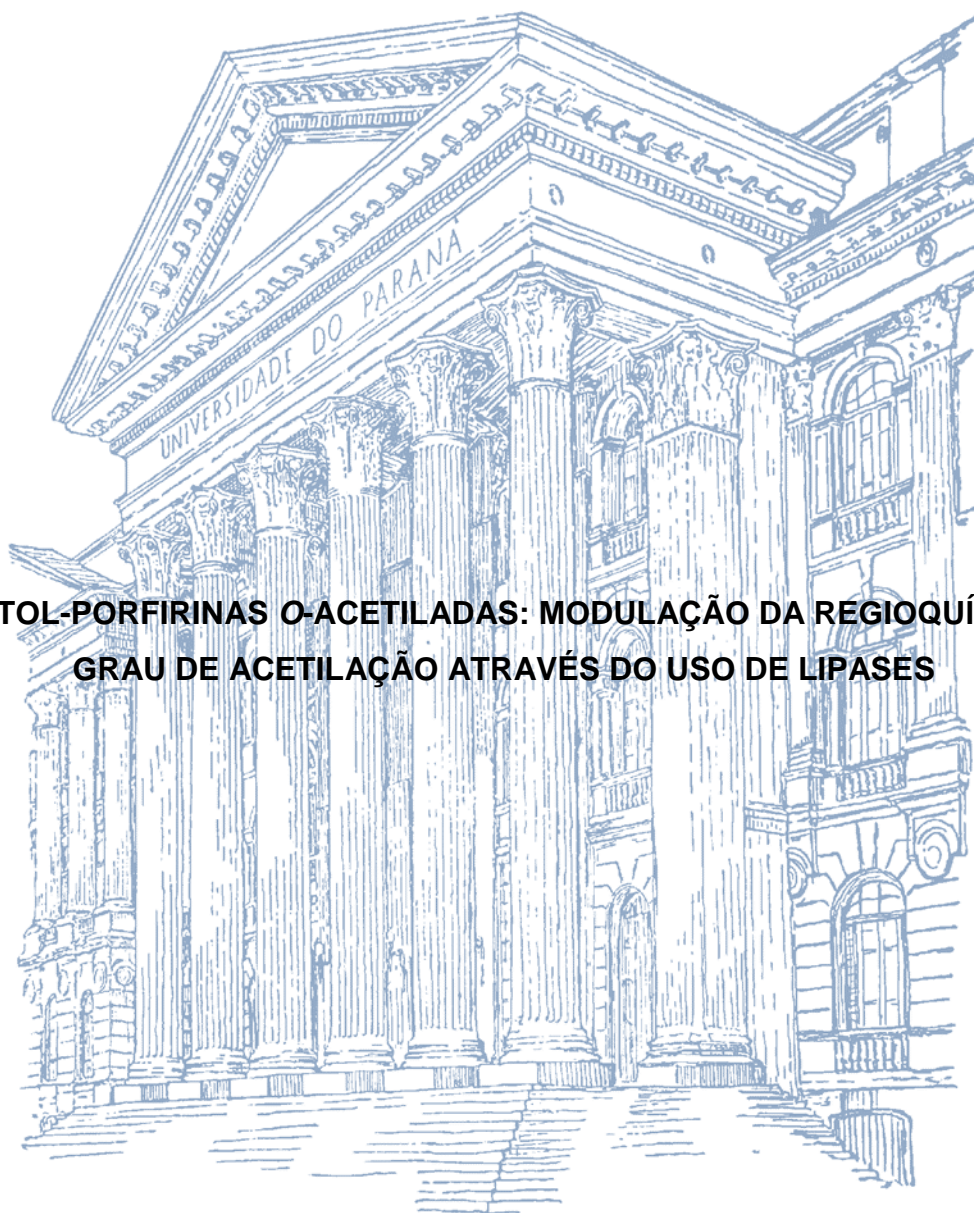


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
MARINA WAGNER PEREIRA

**ALDITOL-PORFIRINAS O-ACETILADAS: MODULAÇÃO DA REGIOQUÍMICA E
GRAU DE ACETILAÇÃO ATRAVÉS DO USO DE LIPASES**



CURITIBA
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
MARINA WAGNER PEREIRA

**ALDITOL-PORFIRINAS O-ACETILADAS: MODULAÇÃO DA REGIOQUÍMICA E
GRAU DE ACETILAÇÃO ATRAVÉS DO USO DE LIPASES**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra M. W. Barreira

Dr^a Stephanie Melissa Siu Ló

CURITIBA
2017

Pereira, Marina Wagner

Alditol-porfirinas O-acetiladas: modulação da regioquímica e grau de acetilação através do uso de lipases / Marina Wagner Pereira – Curitiba, 2017.

137 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Alan Guilherme Gonçalves

Coorientadora: Professora Dra. Sandra M. W. Barreira

Coorientadora: Dra. Stephanie Melissa Siu Ló

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Porfirinas. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Acetilação. 4. Lipase. 5. Hidrólise. I. Gonçalves, Alan Guilherme. II. Barreira, Sandra M. W. III. Ló, Stephanie Melissa Siu. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

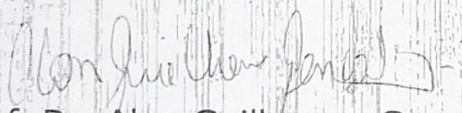
CDD 547.593

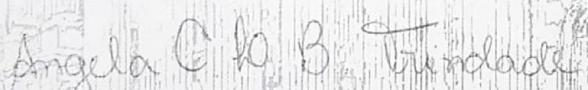
TERMO DE APROVAÇÃO

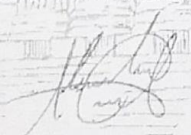
MARINA WAGNER PEREIRA

Título: **"ALDITOL-PORFIRINAS O-ACETILADAS:
MODULAÇÃO DA REGIOQUÍMICA E GRAU DE
ACETILAÇÃO ATRAVÉS DO USO DE LIPASES"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves
Orientador


Profª. Drª. Angela Cristina Leal Badaró Trindade
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Alexandre Orsato
Universidade Estadual de Londrina

Curitiba, 11 de julho de 2016.

À minha família que tornou tudo possível, com todo o amor, apoio, carinho e força para que eu sempre acreditasse e nunca desistisse.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e pela força para não desistir.

Aos meus pais Rosmary e Adaucio pelo amor incondicional, por todo o incentivo e auxílio, vocês são meu porto seguro e mesmo longe, sempre me fizeram sentir amada e me ampararam. Por serem os responsáveis por me ensinar valores, assim como, a importância dos estudos.

À minha avó Kaja, por estar sempre presente e ser dona de um amor inigualável.

Aos meus irmãos Maurício e Felipe, que mesmo entre brigas estiveram sempre ao meu lado me apoiando.

Ao meu orientador Alan, pela confiança, paciência, por toda ajuda e disponibilidade e especialmente por todos os ensinamentos.

Às minhas co-orientadoras Stephanie, por todo o auxílio, experiência e preocupação e Sandra pela oportunidade e apoio.

Às amigas que fiz no mestrado e estiveram sempre presentes durante essa caminhada, compartilhando conquistas e frustrações Mari, Bruna, Andressa, Laura Thais e Paola.

Aos amigos de laboratório, Cami, Ju, Lais, Jacque, Matheus, Ingrid, Gi e Jana por toda a ajuda e companhia.

Às amigas do CEB, Mari e Letícia, por todo o auxílio, força e amizade na reta final do trabalho.

À amiga de uma vida inteira, Lara, por ter roubado uma parte grande do meu coração e ser a dona de uma amizade verdadeira e imensurável.

Aos amigos que acompanharam a minha trajetória e me deram forças sempre que precisei Jacque, Thay, Ste, Edy e Giba, obrigada por estarem sempre por perto.

Aos amigos da dança que foram responsáveis por me trazer alegria nos momentos de distração.

Ao Departamento de Bioquímica e aos professores Miguel Nosedá, Maria Eugênia Duarte e Guilherme Sassaki pela disponibilização do laboratório de pesquisa e equipamentos. Ao Departamento de Química da UFPR e ao professor Anderson Barisson pela disponibilização do equipamento de RMN. Ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto Sustentável (NPDEAS) e à professora Nádia Krieger pela disponibilização do laboratório e das enzimas envolvidas no estudo.

Aos membros da Comissão Examinadora, professores Angela Trindade e Alexandre Orsato pela disponibilidade e atenção.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFPR, CNPq, Fundação Araucária e PRONEX-Carboidratos.

RESUMO

Porfirinas são moléculas que constituem uma das principais classes de fotossensibilizadores, os quais têm utilização na clínica, especialmente na Terapia Fotodinâmica (TFD). O presente trabalho baseou-se na síntese quimioenzimática de glicoporfirinas (especificamente alditol-porfirinas) apresentando diferentes graus de O-acetilação da porção glicídica, bem como no controle regioquímico da introdução dos grupos O-acetila. Esta abordagem sintética pode proporcionar a melhoria das características fotofísicas destas moléculas, favorecendo a utilização das mesmas na TFD. No presente estudo, as reações de acetilação ou desacetilação química foram utilizadas para gerar glicoporfirinas completamente protegidas ou desprotegidas. Além disso, foram realizadas reações de acetilação ou desacetilação enzimática, através do uso da lipase imobilizada de *Candida antarctica B* (CAL-B, Novozym 435 – Novozymes®), para geração de graus intermediários de acetilação. As reações de acetilação enzimática mostraram-se regiosseletivas, gerando uma única porfirina (diacetilada – posições 5 da porção glicídica) parcialmente acetilada. Já as reações de hidrólise enzimática originaram uma mistura de produtos, evidenciando uma baixa seletividade enzimática. As porfirinas sintetizadas neste trabalho foram: porfirina **5** (completamente acetilada, contendo dez grupamentos O-acetila); porfirina **6** (porfirina completamente desacetilada); porfirina **37** (contendo dois grupamentos O-acetila, regiosseletivamente inseridos nas hidroxilas primárias da porção glicídica). Também foi obtida uma mistura de porfirinas, contendo principalmente nove grupamentos O-acetila. As propriedades fotofísicas das porfirinas obtidas (fotoestabilidade e produção de $^1\text{O}_2$) foram avaliadas, indicando que o grau de acetilação influencia significativamente estas propriedades.

Palavras-chave: porfirina, glicoporfirina, reação enzimática.

ABSTRACT

Porphyrins constitute one of the main classes of photosensitizers, which are used clinically in photodynamic therapy (PDT). The present study was based on the chemoenzymatic synthesis of glycoporphyrins (specifically alditol-porphyrins) in order to generate porphyrins having different degrees of O-acetylation of the glycidic moiety through regiochemical reactions. This approach can be considered a tool to obtain porphyrins with improved photophysical characteristics, favoring their usage in PDT. In the present study, chemical acylation and deacylation reactions were used to obtain completely protected or unprotected porphyrins, which served as starting materials for the enzymatic acylation reactions. The starting materials were then submitted to enzymatic acylation or deacylation using *Candida antarctica* lipase B (CAL-B, Novozym 435 - Novozymes®) for the generation of porphyrins having distinct degrees of acylation. Enzymatic acylation reactions showed regioselectivity, specifically originating a diacylated glycoporphyrin, while the enzymatic hydrolysis presented low regioselectivity, providing a porphyrin mixture. In sum, the porphyrins herein synthesized were: porphyrin **5** (completely acylated, with ten O-acyl groups); porphyrin **6** (completely deacylated); porphyrin **37** (with two O-acyl groups, placed at the primary hydroxyls of the sugar moiety). The mixture of porphyrins obtained through the deacylation reaction was predominantly composed by products with nine O-acyl groups. The photophysical properties of these compounds, including photostability evaluation and singlet oxygen production, were measured. It was found that the different acylation degrees shown by the porphyrins evaluated reflect into distinct photophysical properties.

Key-words: porphyrin, glycoporphyrin, enzymatic reaction.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	18
2.	OBJETIVOS	20
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1.	PORFIRINAS.....	22
3.1.1.	Aspectos gerais	22
3.1.2.	Aspectos fotofísicos das porfirinas	24
3.2.	TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOINATIVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS	27
3.2.1.	Fotossensibilizadores	29
3.3.	SÍNTESE DE PORFIRINAS	30
3.4.	GLICOPORFIRINAS: SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA	31
3.5.	CONTROLE DO GRAU DE ACETILAÇÃO DE GLICOCONJUGADOS	34
3.5.1.	Métodos químicos de acetilação e desacetilação de glicídios.....	34
3.5.2.	Métodos enzimáticos de acetilação e desacetilação de glicídios	36
4.	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1.	MÉTODOS GERAIS.....	41
4.1.1.	Cromatografia em camada delgada (CCD)	41
4.1.2.	Coluna cromatográfica sob pressão (<i>dry flash chromatography</i>)	42
4.1.3.	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	42
4.1.4.	Espectrometria de massas	43
4.1.4.1.	Ionização por dessorção de matriz assistida por laser acoplada a analisador de massas por tempo de voo (MALDI-TOF).....	43
4.1.4.2.	Ionização por <i>eletrospray</i> acoplada à espectrometria de massas (ESI-MS)	44
4.1.5.	Espectrometria na região do ultravioleta-visível	45
4.2.	SÍNTESES.....	45
4.2.1.	Reações enzimáticas.....	46
4.3.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	46
4.3.1.	Atividade de hidrólise enzimática em meio aquoso	46
4.3.2.	Atividade de hidrólise enzimática em meio orgânico	47
4.3.2.1.	Preparo do reativo de cor	48

4.3.2.2. Curva de calibração.....	48
4.3.2.3. Método.....	48
4.4. ENSAIOS FOTOFÍSICOS	49
4.4.1. Fotoestabilidade de porfirinas.....	49
4.4.2. Produção de oxigênio singleto.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. OBTENÇÃO DA PORFIRINA (5).....	52
5.2. DESACETILAÇÃO QUÍMICA	56
5.2.1. Delineamento de reações de desacetilação química.....	56
5.2.2. Desacetilação química partindo do material inicial peracetilados em diferentes formas sólidas	63
5.2.3. Desacetilação química auxiliada pelo uso de tensoativos	64
5.2.4. Otimização do rendimento da porfirina desacetilada 6	66
5.3. DESACETILAÇÃO ENZIMÁTICA	68
5.3.1. Desacetilação enzimática por transesterificação	68
5.3.2. Atividade enzimática em meio aquoso	69
5.3.3. Atividade enzimática em meio orgânico	70
5.3.4. Desacetilação enzimática na presença de água	71
5.3.5. Reutilização da enzima.....	74
5.3.6. Escalonamento da reação de desacetilação enzimática	74
5.3.6.1. Purificação dos produtos de desacetilação enzimática	75
5.4. Acetilação enzimática	80
5.5. UV-VISÍVEL E ESTUDOS FOTOFÍSICOS	87
5.5.1. UV-Visível.....	88
5.5.2. Fotoestabilidade	89
5.5.3. Produção de Oxigênio Singleto	92
5.5.3.1. Rendimento quântico de oxigênio singleto	94
REFERÊNCIAS.....	100
ANEXOS	108

LISTA DE ABREVIATURAS

100T – lipase de *Rhizomucor miehei* Nordisk®
120T – α -amilase de *Bacillus licheniformis* Novozymes®
Ac – grupo acetila
CAL-B – lipase de *Candida antarctica B* Novozymes®
CCD – cromatografia em camada delgada
CCL – lipase de *Candida cylindracea* Fluka®
CETAVLON – tensoativo catiônico brometo de cetiltrimetilamônio
COSY – *correlation spectroscopy*
DDQ – oxidante 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
Et – grupo etila
FIM – fotoinativação microbiana
FS – fotossensibilizador
HMBC – *heteronuclear multiple bond correlation*
HSQC – *heteronuclear single quantum coherence*
LSS - tensoativo aniônico lauril sulfato de sódio
MALDI-TOF – espectro de massas obtido por aparelho MALDI-TOF/MS
Me – grupo metila
Ph – grupo fenila
RMIM – lipase de *Mucor miehei* Novozymes®
RMN – ressonância magnética nuclear
TA – temperatura ambiente
TFD – terapia fotodinâmica
TLIM – lipase de *Thermomyces lanuginosus* Novozymes®
TRITONx100 - surfactante não iônico
UV – ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do anel porfirínico 7 (porfina).	22
Figura 2: Nomenclatura do anel porfirínico segundo Fischer 8.	23
Figura 3: Nomenclatura do anel porfirínico segundo a IUPAC 9.	23
Figura 4: Determinação de posições específicas do anel porfirínico por Fischer 8.	24
Figura 5: Estrutura dos derivados porfirínicos do tipo clorina 10 e bacterioclorina 11. Nas estruturas químicas são indicados os locais das duplas ligações reduzidas, tomando-se como base o núcleo porfirínico.	24
Figura 6: Espectro de UV-Visível característico de uma porfirina, onde se destacam a posição das bandas Q e da banda de Soret.	25
Figura 7: Diagrama de Jablonski modificado (Bonnet, 1995).	27
Figura 8: Dipirrometanos derivados da galactose (12), glucose (13), manose (14), lactose (15) e agarose (16) (LÓ et al., 2013).	33
Figura 9: Carbamato 17 e tiocarbamato 18 glicoporfirinas (DALLAGNOL et al., 2014). .	33
Figura 10: Estrutura genérica de uma α/β -hidrolase. As α hélices são representadas pelos cilindros, e as folhas β são representadas por setas. A posição topológica dos resíduos do sítio ativo é representada pelos círculos sólidos (Nucleófilo, Asp/Glu, His) (Adaptada de OLLIS et al., 1992; JAEGER et al., 1999).	37
Figura 11: Estrutura da CAL-B pertencente a classe de lipases α/β -hidrolase. As α -hélices estão representadas em vermelho, enquanto as folhas β estão representadas em verde claro e a superfície da enzima em verde escuro. Pode-se visualizar o final do grupamento acila e álcool na entrada do sítio ativo (MAGNUSSON, 2005).	38
Figura 12: Posicionamento da LUMACARE® e filtros para obtenção de intensidade de luz de $9,0 \text{ mW/cm}^2$ e comprimento de onda na faixa de 550–800 nm.	51
Figura 13: CCD da reação de desacetilação química de número 3 (A) porfirina 6; (B) porfirina penta-acetilada (36).	58
Figura 14: Espectro de massa (MALDI-TOF) da glicoporfirina totalmente desacetilada 6 com íon m/z 763,429 $[M+H]^+$	58
Figura 15: Espectro de massas (MALDI-TOF) da glicoporfirina penta-acetilada 36 com m/z 973,521 $[M+H]^+$	59
Figura 16: CCD da reprodução da reação 3 R1 e padrão (P6 – padrão porfirina 6; P36 – padrão porfirina penta-acetilada 36).	60
Figura 17: CCD da reação de desacetilação química de número 13.	60

Figura 18: Espectros de RMN de ^1H a 30°C (200,1 MHz – DMSO-d_6) das porfirinas 5 (A), penta-acetilada 36 (B) e 6 (C).....	62
Figura 19: CCD das reações de desacetilação partindo de material inicial 5 obtido por diferentes formas de purificação.....	64
Figura 20: CCD das reações de desacetilação auxiliadas pelo uso de tensoativo.	65
Figura 21: Espectro de massas (MALDI-TOF) da reação de desacetilação de número 27 (Tabela 6). Os íons de m/z 1184 1142, 1100 e 1058 $[\text{M}+\text{H}]^+$, correspondem à glicoporfirinas contendo dez, nove, oito e sete grupos O-acetila, respectivamente.	73
Figura 22: A – Aplicação de amostra em placa de CCD preparativa com auxílio de pipeta pasteur; B – Cubas de eluição de placas de CCD preparativa.	75
Figura 23: Fases móveis CCD preparativa para reações de desacetilação enzimática: A – acetato de etila: hexano (1:1); B – clorofórmio: metanol (3%); C – THF:ciclohexano (1:1).....	77
Figura 24: A- Espectro de massas de MALDI-TOF da mistura reacional da reação de desacetilação enzimática. B- Espectro de massas da reação de desacetilação enzimática, após a purificação.....	79
Figura 25: Espectro de massas MALDI-TOF da porfirina di-O-acetilada (porfirina 37)...82	82
Figura 26: Estrutura numerada da glicoporfirina 37.....	84
Figura 27: Espectro de correlação $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC da glicoporfirina 37.....	84
Figura 28: Espectro de correlação $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY da glicoporfirina 37	85
Figura 29: Espectro de correlação de ligações múltiplas $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HMBC da glicoporfirina 37	86
Figura 30: Estrutura das porfirinas avaliadas por espectrometria de UV-Visível e quanto aos quesitos fotofísicos.	87
Figura 31: Espectro de UV-Visível das porfirinas sintetizadas (300-800 nm), com observação da banda de Soret.....	88
Figura 32: Espectro de UV-Visível das porfirinas sintetizadas (400-750 nm), com observação das bandas Q.....	88
Figura 33: Reação entre o DFIBF e o $^1\text{O}_2$ para a formação de endoperóxido.....	92
Figura 34: Espectro de RMN ^1H a 30°C (CD_3OD – 200,1 MHz) da galactose dietilditioacetal 2, calibrado em 3,31 (CD_3OD) e molécula com atribuições.....	111
Figura 35: Espectro de RMN ^1H a 30°C (CDCl_3 – 200,1 MHz) da 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-galactose dietilditioacetal 3, calibrado em 7,27 (CDCl_3) e molécula com atribuições.	113

Figura 36: Espectro de RMN ^1H a 30°C (DMSO- d_6 – 200,1 MHz) do 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-1,1-dipirril-D-galactitol 4, calibrado em 2,51 (DMSO- d_6) e molécula com atribuições.	115
Figura 37: Espectro de RMN ^1H a 70°C (DMSO- d_6 – 400,1 MHz) da porfirina 5, calibrado em 2,51 (DMSO- d_6) e molécula com atribuições.	118
Figura 38: Espectro de RMN ^{13}C a 70°C (DMSO- d_6 – 100,63 MHz) da porfirina 5, calibrado em 39,50 (DMSO- d_6) e molécula com atribuições.	119
Figura 39: Espectro de massas MALDI-TOF da porfirina 5.	120
Figura 40: Espectro de massas Q-TOF da porfirina 5.	120
Figura 41: Espectro de RMN ^1H a 70°C (DMSO- d_6 – 400,1 MHz) da porfirina 6, calibrado em 2,51 (DMSO- d_6) e molécula com atribuições.	126
Figura 42: Espectro de RMN ^{13}C a 70°C (DMSO- d_6 – 100,63 MHz) da porfirina 6, calibrado em 39,50 (DMSO- d_6) e molécula com atribuições.	127
Figura 43: Espectro de massas MALDI-TOF da porfirina 6.	128
Figura 44: Espectro de massas Q-TOF da porfirina 6.	128
Figura 45: Espectro de massas MALDI-TOF da reação de desacetilação enzimática.	131
Figura 46: Espectro de massas MALDI-TOF da reação de desacetilação enzimática após purificação, contendo especialmente a porfirina contendo 9 grupamentos O-acetila, com uma pequena quantidade de porfirina contendo 8 grupamentos O-acetila.	131
Figura 47: Espectro de massas Q-TOF da reação de desacetilação enzimática após purificação, contendo especialmente a porfirina contendo 9 grupamentos O-acetila, sodiada e potassada.	132
Figura 48: Espectro de massas Q-TOF da reação de desacetilação enzimática após purificação, mostrando a existência de pequena quantidade de porfirina contendo 8 grupamentos O-acetila.	132
Figura 49: Espectro de RMN ^1H a 70°C (DMSO- d_6 – 400,1 MHz) da porfirina 37, calibrado em 2,51 (DMSO- d_6) e molécula com atribuições.	135
Figura 50: Espectro de RMN ^{13}C a 70°C (DMSO- d_6 – 100,63 MHz) da porfirina 37, calibrado em 39,50 (DMSO- d_6) e molécula com atribuições.	136
Figura 51: Espectro de massas MALDI-TOF da porfirina 37.	137
Figura 52: Espectro de massas Q-TOF da porfirina 37.	137

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Estratégia global de síntese químico-enzimática de glicoporfirinas com diferentes graus de acetilação.	21
Esquema 2: Rota sintética para obtenção do dissacarídeo-metilglicosídeo 26 envolvendo passos de proteção e desproteção das hidroxilas com grupos acetila.	36
Esquema 3: Acetilação seletiva promovido pela enzima CAL-B (LJUNGER et al., 1994).	39
Esquema 4: Desacetilação promovida pela enzima CRL em diferentes pHs (TERRINI et al., 2002).	39
Esquema 5: Equilíbrio entre a forma cíclica e a forma aldeídica da galactose.	52
Esquema 6: Mecanismo de reação para a formação da galactose dietilditioacetal (2). ...	53
Esquema 7: Mecanismo de reação para a formação do 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-galactose dietilditioacetal (3).	54
Esquema 8: Mecanismo de reação para a formação do 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-1-desoxi-1,1-dipirril-D-galactitol (4).	55
Esquema 9: Reação para a obtenção da 5,15-[bis(fenil)]-10,20-[bis(1-desoxi)-2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-galactitol]porfirina (porfirina 5).	56
Esquema 10: Reação para a obtenção da porfirina 6.	67
Esquema 11: Reação para a obtenção da porfirina 37.	83
Esquema 12: Síntese da galactose dietilditioacetal 2.	110
Esquema 13: Síntese do 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-galactose dietilditioacetal 3.	112
Esquema 14: Síntese do 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-1,1-dipirril-D-galactitol 4.	115
Esquema 15: Síntese de 5,15-[bis(fenil)]-10,20-[bis(1-desoxi)-2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-galactitol]porfirina 5	117
Esquema 16: Estratégia de síntese química de galactoporfirina totalmente desacetilada utilizando metanol e diclorometano como solvente.	121
Esquema 17: Estratégia de síntese química de galactoporfirina totalmente desacetilada utilizando metanol, THF e éter etílico como solvente.	122
Esquema 18: Síntese da porfirina 6 via desacetilação química.	125
Esquema 19: Reação de desacetilação enzimática.	130
Esquema 20: Síntese da porfirina 37 via acetilação enzimática.	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de métodos químicos para a desacetilação da glicoporfirina 5 e produtos obtidos.	57
Tabela 2: Condições de reações de desacetilação química, partindo de material inicial 5, obtido por diferentes métodos de purificação.	64
Tabela 3: Reações de desacetilação química auxiliadas pelo uso de tensoativo.	65
Tabela 4: Resultados da otimização de rendimento da porfirina 6, utilizando metóxido de sódio como base.	66
Tabela 5: Resultados para atividade de hidrólise enzimática em meio aquoso	69
Tabela 6: Avaliação qualitativa da ocorrência de desacetilação por hidrólise enzimática a partir da porfirina 5, através da utilização de diferentes lipases imobilizadas comerciais.	72
Tabela 7: Resultados da condição 1 de acetilação enzimática.	80
Tabela 8: Condições das reações de acetilação enzimática.	81
Tabela 9: Rendimento quântico (Φ_{Δ}) de $^1\text{O}_2$ das porfirina 5, 6, 37 e desacetilado parcial 36 e coeficiente angular do consumo de DFIBF (R).	97

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Curva de atividade de hidrólise enzimática em meio aquoso.	69
Gráfico 2: Curva de calibração do reagente de cor para determinação de atividade de hidrólise enzimática em meio orgânico.	70
Gráfico 3: Curva de determinação da atividade de hidrólise enzimática em meio orgânico.	70
Gráfico 4: Decaimento da absorbância da banda de Soret através do tempo na ausência de irradiação luminosa das porfirinas em solução aquosa.	89
Gráfico 5: Decaimento da absorbância da banda de Soret através do tempo, na ausência de irradiação luminosa das porfirinas em solução contendo diferentes concentrações de SDS.	90
Gráfico 6: Decaimento da absorbância da banda de Soret através do tempo na presença de irradiação luminosa (100 mW/cm^2) das porfirinas em solução aquosa.	91
Gráfico 7: Decaimento da absorbância da banda de Soret através do tempo na presença de irradiação luminosa (100 mW/cm^2) das porfirinas em solução aquosa com o valor do decaimento da banda de Soret da porfirina 37 corrigido.	91
Gráfico 8: Decaimento da absorbância em 415 nm numa solução de DFiBF ($50 \text{ } \mu\text{mol/L}$) e porfirina ($0,5 \text{ } \mu\text{mol/L}$) em DMF:água (9:1), após a irradiação à 9 mW/cm^2 , na faixa de comprimento de onda de 550-800 nm.	93
Gráfico 9: Decaimento da absorbância do DFiBF em função da produção de oxigênio singlete pelo azul de metileno.	94
Gráfico 10: Decaimento da absorbância do DFiBF em função da produção de oxigênio singlete pela porfirina 5.	95
Gráfico 11: Decaimento da absorbância do DFiBF em função da produção de oxigênio singlete pelo desacetilado parcial 36, composto principalmente por uma porfirina, ou mistura, contendo nove grupamentos O-acetila.	95
Gráfico 12: Decaimento da absorbância do DFiBF em função da produção de oxigênio singlete pela porfirina 37.	96
Gráfico 13: Decaimento da absorbância do DFiBF em função da produção de oxigênio singlete pela porfirina 6.	96

1. INTRODUÇÃO

Porfirinas e compostos relacionados como clorinas e bacterioclorinas são onipresentes na natureza, tendo funções catalíticas, de transferência de energia, absorção de luz e agindo como ligantes e transportadores de moléculas pequenas, além do uso crescente na terapia fotodinâmica (TOMÉ et al., 2005).

A terapia fotodinâmica (TFD) é um processo em dois passos, que envolve a administração sistêmica ou tópica de um fotossensibilizador (FS), seguida da irradiação de luz visível no local desejado, onde ocorre então um dano foto-oxidativo e consequentemente eliminação de células ou tecidos indesejados (CALZAVARA-PINTON et al., 2005).

A possibilidade de usar a TFD como uma alternativa não antibiótica para o tratamento de doenças causadas por micro-organismos é altamente promissora visto que a ativação dos FSs gera espécies reativas de oxigênio que afetam ou destroem a membrana bacteriana. Além disso, a TFD é utilizada na dermatologia como tratamento de uma variedade de tumores malignos e algumas doenças inflamatórias. Outra aplicação importante acontece com a desinfecção de produtos sanguíneos (CALZAVARA-PINTON et al., 2005; TOMÉ et al., 2004).

As porfirinas atualmente utilizadas na TFD apresentam baixa seletividade ao tecido alvo. Além disso, devido suas características hidrofóbicas, algumas tendem a permanecer no organismo após o tratamento, causando efeitos como a fotossensibilidade cutânea (ZHENG et al., 2008). Por este motivo, a introdução de grupos polares é requerida para aumentar a hidrofiliidade destas moléculas. Alguns grupos de pesquisa estão envolvidos na modificação estrutural das porfirinas com objetivo de gerar compostos com propriedades fotofísicas e hidrofóbicas/hidrofílicas requeridas para um FS ideal (TOMÉ et al., 2005; TOMÉ et al., 2007).

Para solucionar alguns problemas relacionados aos FSs disponíveis no mercado, novas moléculas vêm sendo pesquisadas com a finalidade de se obter FSs com menor número e intensidade de efeitos adversos, o que poderia resultar numa ação mais específica. Algumas características são necessárias para a melhoria do FS, tais como: estabilidade biológica, anfifilicidade, baixa toxicidade na ausência de luz, retenção específica no tecido-alvo, baixa toxicidade ao tecido normal, eficiência em gerar oxigênio singlete e alta absorção em comprimento de

onda entre 700 e 800 nm, faixa espectral na qual a radiação apresenta maior penetração no tecido (CHEN et al., 2004; ZEHNG et al., 2008).

Uma vez que muitos carboidratos estão envolvidos em processos celulares como reconhecimento, metabolismo e marcação celular, a associação de fármacos a porções glicídicas é considerada uma estratégia promissora quando se trata do aumento da especificidade de ação destas moléculas. A permeabilidade celular também é melhorada, devido ao caráter anfifílico do glicoconjugado resultante. Do mesmo modo, a glicosilação de uma porfirina pode diminuir seu potencial de causar fotossensibilidade cutânea prolongada, pelo aumento da hidrofiliabilidade da molécula e facilitação de processos de eliminação do FS (CHEN et al., 2004; MIKATA et al., 1998; ZEHNG et al., 2008).

A maioria dos métodos sintéticos descritos para a obtenção de porfirinas glicosiladas dá origem a moléculas per-O-acetiladas, uma vez que o grupo acetila é o grupo protetor mais utilizado para a proteção de hidroxilas na síntese de glicoconjugados. Estas moléculas são então desacetiladas para a exposição das hidroxilas para posterior avaliação biológica. Entretanto, ao estudar glicoporfirinas, Mikata verificou que o grau de acetilação das moléculas afeta a captação das mesmas pelas células-alvo e, conseqüentemente, suas propriedades fotodinâmicas (MIKATA et al., 1998). Deste modo, o estudo do número de grupos acetila, bem como a regioquímica dos mesmos, pode ser considerada uma ferramenta importante na busca de um FS glicoporfirínico.

A regiosseletividade apresentada na catálise enzimática, conferida por diferentes tipos de lipases, pode viabilizar a síntese de carboidratos acilados em hidroxilas específicas, os quais podem apresentar propriedades físico-químicas e fotodinâmicas melhoradas. A síntese de carboidratos com diferentes características de balanço hidrofóbico/hidrofílico pode ser obtida pelo controle do grau de esterificação, justificando o uso de tais lipases (PLOU et al., 2002). Adicionalmente, o emprego de métodos sintéticos enzimáticos para a acetilação/desacetilação de moléculas glicoconjugadas são conduzidos em condições brandas, além de permitir a reutilização das lipases para outras reações. Deste modo, esses métodos são considerados ecologicamente corretos (SEBRÃO et al., 2011).

Desta maneira, o presente projeto propõe a síntese químico-enzimática de glicoporfirinas com diferentes graus de acetilação e posicionamento dos grupos O-acetila para avaliação de suas propriedades fotofísicas.

2. OBJETIVOS

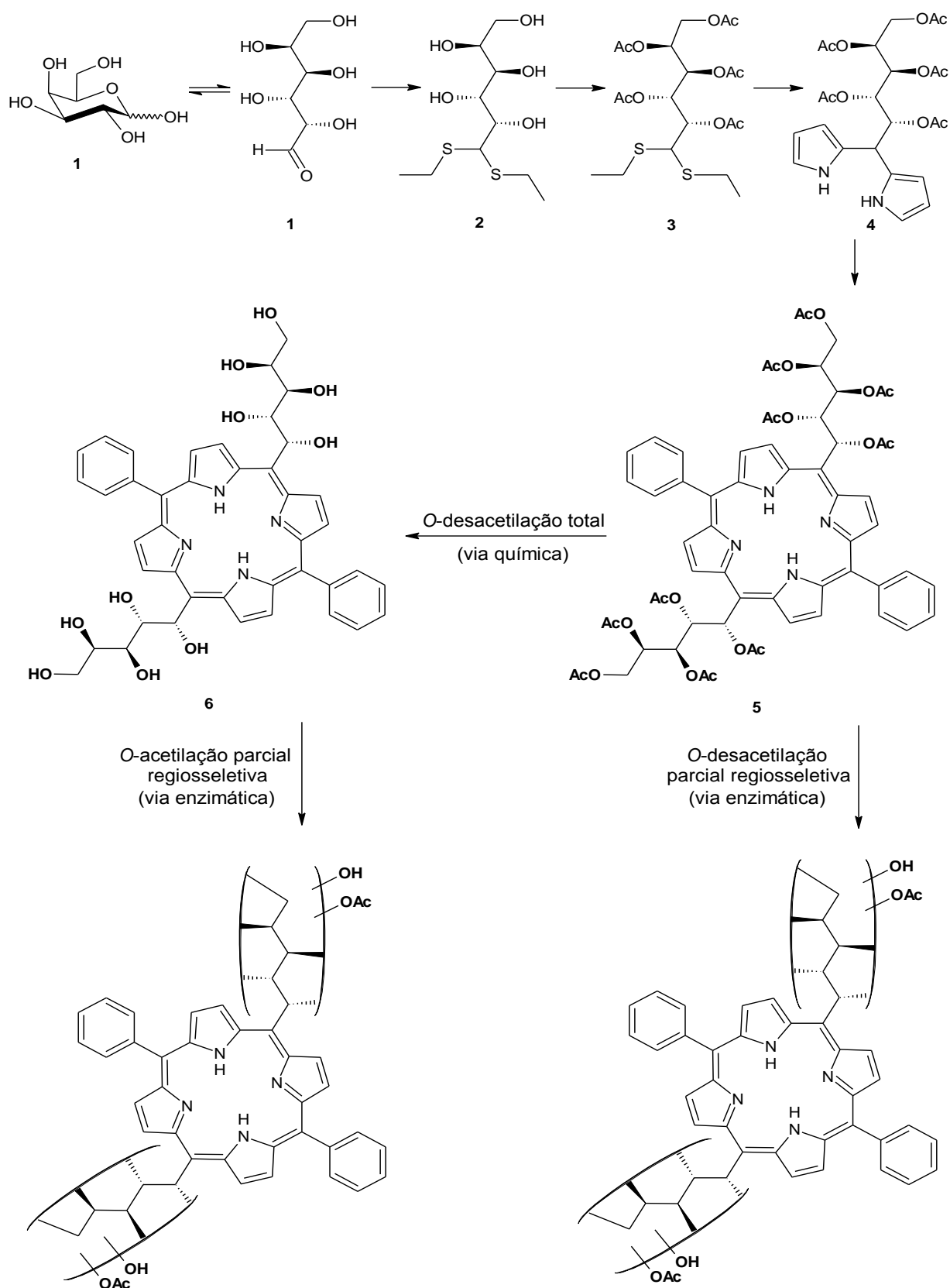
2.1. OBJETIVO GERAL

Sintetizar glicoporfirinas apresentando diferentes regioquímica e grau de O-acetilação da porção glicídica e avaliar suas propriedades fotofísicas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir da definição da proposta do presente trabalho, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Sintetizar uma glicoporfirina peracetilada modelo, contendo dez grupos O-acetila, especificamente a 5,15-[bis(fenil)]-10,20-[bis(1-desoxi)-2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-galactitol]porfirina (**5**) (Esquema 1);
- Estudar a desacetilação total e parcial da glicoporfirina-modelo (**5**), por via química e enzimática (Esquema 1);
- Estudar a acetilação regiosseletiva da glicoporfirina totalmente desatilada por via enzimática (Esquema 1);
- Determinar propriedades fotofísicas das glicoporfirinas.



Esquema 1: Estratégia global de síntese químico-enzimática de glicoporfirinas com diferentes graus de acetilação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

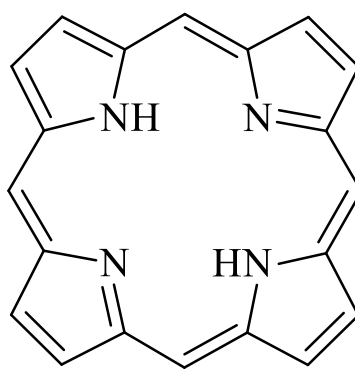
3.1. PORFIRINAS

3.1.1. Aspectos gerais

Porfirinas constituem uma importante classe de compostos macrocíclicos encontrados em sistemas biológicos, que desempenham papéis importantes no metabolismo de seres vivos. Dois exemplos são (a) a hematoporfirina, encontrada no grupo heme da hemoglobina humana e (b) o macrociclo do tipo clorina (derivado reduzido de uma porfirina) encontrada na clorofila (GIOVANNETTI, 2012).

A palavra porfirina tem suas origens no mundo clássico da Grécia antiga. Naquela época, a palavra grega *porphura* era utilizada para descrever a cor púrpura. Esta informação nos remete a uma das principais características das porfirinas: a intensa coloração púrpura apresentada por estas substâncias (MILGROM, 1997).

A estrutura de uma porfirina foi sugerida pela primeira vez em 1912 por Küster, e sintetizada com pirrol como material de partida em 1929 por Fischer. A partir daí, foi comprovada a estrutura do macrociclo porfirínico, o qual é composto por quatro anéis pirrólicos ligados por pontes metínicas, como representado na Figura 1 (MILGRON, 1997).



7

Figura 1: Estrutura do anel porfirínico **7** (porfina).

Porfirinas podem ser nomeadas de duas maneiras diferentes, seguindo a nomenclatura de Fischer ou através do sistema proposto pela IUPAC. Estes sistemas de nomenclatura estão representados, respectivamente, na Figura 2 e Figura 3 (MILGRON, 1997).

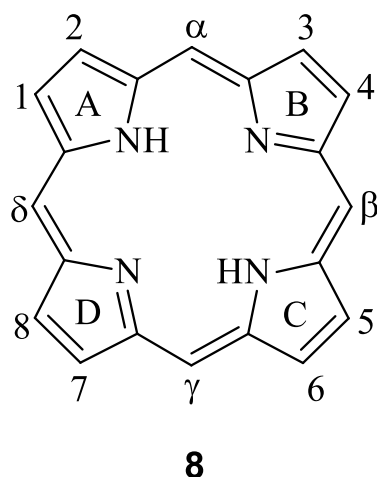


Figura 2: Nomenclatura do anel porfirínico segundo Fischer **8**.

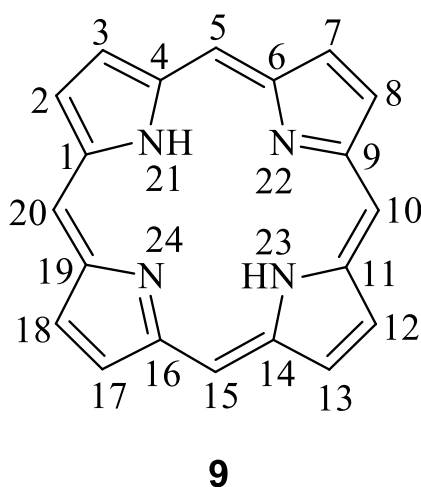


Figura 3: Nomenclatura do anel porfirínico segundo a IUPAC **9**.

A nomenclatura de Fischer denomina os quatro anéis pirrólicos com letras de A a D, as pontes metínicas que interligam os anéis por α , β , γ e δ , e os carbonos externos dos anéis pirrólicos de um a oito, começando pelo anel A. Enquanto isso, a nomenclatura da IUPAC nomeia os carbonos do macrociclo de um a 20, e os nitrogênios internos à molécula de 21 a 24. Além disso, para facilitar a nomenclatura de porfirinas substituídas, Fischer criou a denominação das posições, α , β e *meso* pirrólica, como demonstrado na Figura 4 (MILGRON, 1997).

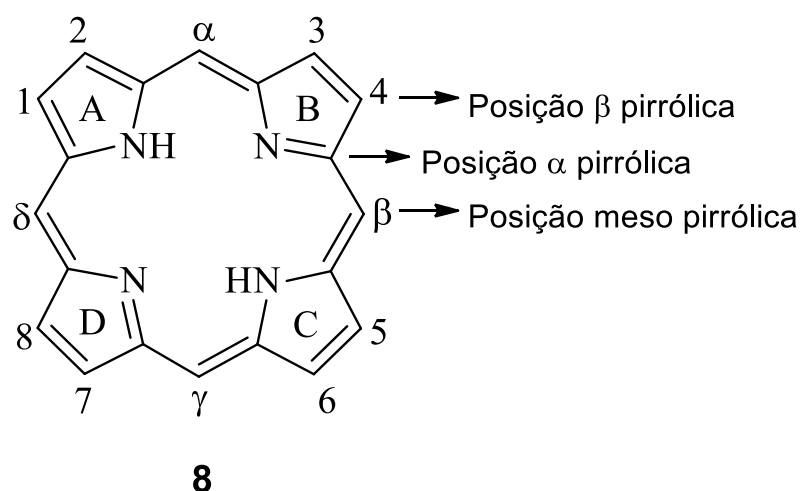


Figura 4: Determinação de posições específicas do anel porfirínico por Fischer **8**.

As porfirinas podem sofrer reduções e originar derivados como clorinas e bacterioclorinas, como demonstrado na Figura 5 (CALZAVARA et al., 2007).

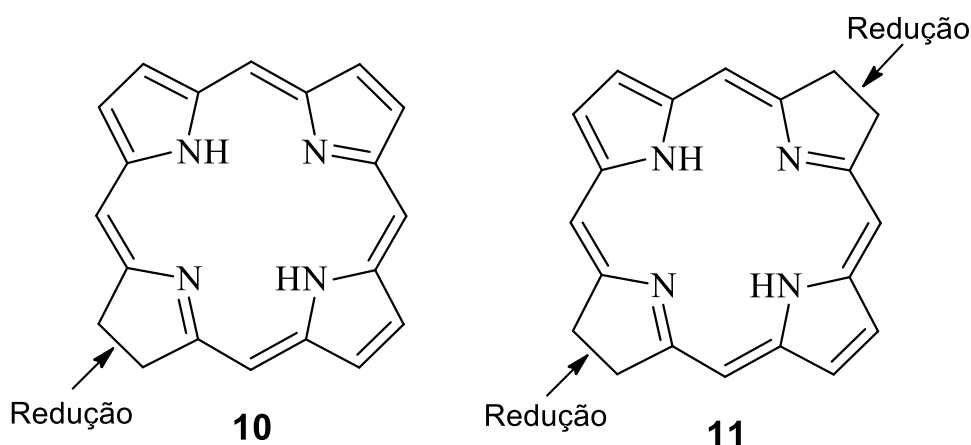


Figura 5: Estrutura dos derivados porfirínicos do tipo clorina **10** e bacterioclorina **11**. Nas estruturas químicas são indicados os locais das duplas ligações reduzidas, tomando-se como base o núcleo porfirínico.

3.1.2. Aspectos fotofísicos das porfirinas

A estrutura química de uma porfirina é baseada num esqueleto carbônico composto por 20 átomos de carbono que envolve um *core* central de quatro átomos de nitrogênio. Este arranjo suporta uma configuração eletrônica estável de ligações simples e duplas, fato que confere à molécula aromaticidade (MILGRON, 1997). Por

esse motivo, as porfirinas comumente apresentam absorção de luz UV-visível entre 390–425 nm, dependendo se a porfirina tem substituições nas posições β ou meso pirrólica. Esta absorção é representada no espectro de UV-visível pelo aparecimento de uma banda B, denominada banda de Soret, seguida de absorções mais fracas na região compreendida entre 480–700 nm, denominadas bandas Q, como representado na Figura 6 (MILGRON, 1997).

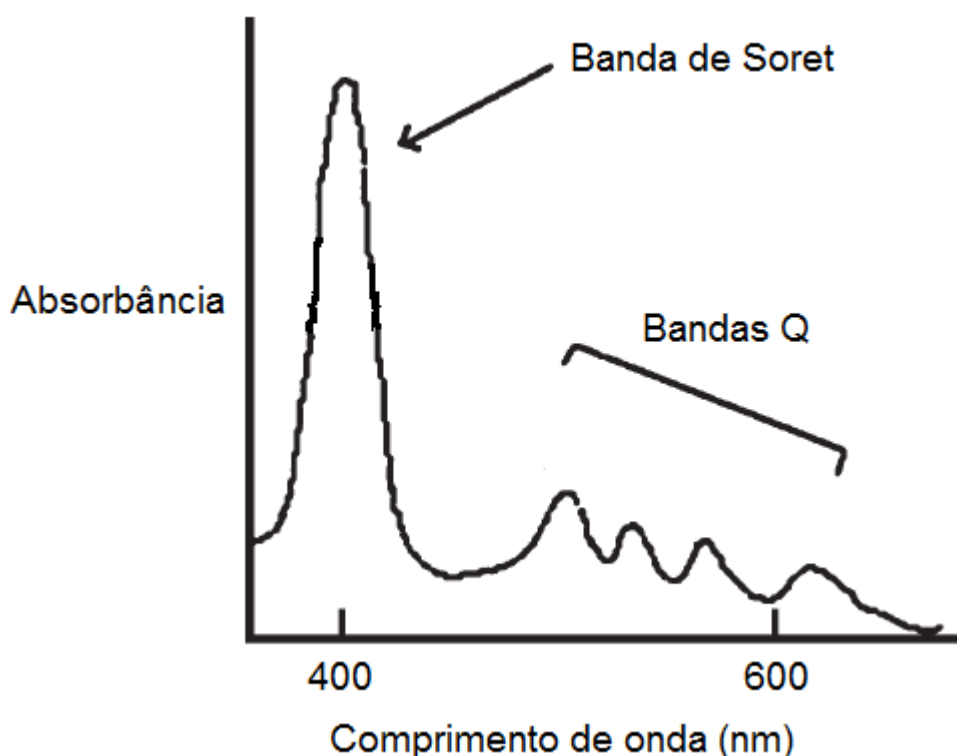


Figura 6: Espectro de UV-Visível característico de uma porfirina, onde se destacam a posição das bandas Q e da banda de Soret.

As porfirinas constituem uma das principais classes de FSs utilizados na terapêutica, especificamente na terapia fotodinâmica (TFD). Neste contexto, FSs são moléculas capazes de absorver energia luminosa, se tornar eletronicamente excitadas, e posteriormente transferir a energia adquirida à uma segunda molécula (MILGRON, 1997). Na TFD, os FSs não podem ser classificados como agentes quimioterápicos comuns, e sim como agentes quimiofototerápicos, visto que, sua ação está condicionada a presença de luz. Estes compostos absorvem energia diretamente de uma fonte luminosa, em um comprimento de onda específico, e a transmitem ao oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio *in situ* (BROWN et al., 2004).

Com a absorção de energia, o FS (PS) atinge o estado singleto $^1PS^*$ e outros estados singletos excitados ($^1PS_n^*$). A partir do estado $^1PS^*$ o fotossensibilizador pode passar a um estado tripleto $^3PS^*$, através do cruzamento de intersistemas (Figura 7). No primeiro caso (a partir de $^1PS^*$), a energia pode ser dissipada pela emissão de fluorescência. No segundo caso (a partir de $^3PS^*$), a energia pode ser dissipada pela emissão de fosforescência ou pela transferência de energia para uma segunda molécula que se encontre no estado tripleto, geralmente uma molécula de oxigênio no estado fundamental tripleto (3O_2). O oxigênio singleto (1O_2) formado a partir desta transferência de energia reage rapidamente com biomoléculas específicas (MILGRON, 1997).

Segundo Derosa e colaboradores (2002), quando o fotossensibilizador está no estado tripleto podem ocorrer danos celulares através de dois mecanismos:

Mecanismo tipo I – O FS que se encontra no estado excitado tripleto reage diretamente com moléculas que estão próximas por processos de transferência de elétrons formando radicais livres.

Mecanismo do tipo II – O FS no estado excitado tripleto transfere a sua energia para o oxigênio molecular no estado fundamental 3O_2 , convertendo-o em 1O_2 . Supõe-se que o 1O_2 seja a principal espécie reativa de oxigênio envolvida na destruição de alvos biológicos.

O processo de fotossensibilização é mostrado no diagrama de Jablonski modificado (Figura 7), que apresenta as diversas transições que um elétron sofre após passar ao estado excitado.

O 1O_2 é uma espécie altamente reativa e oxidante, reagindo indiscriminadamente com uma série de biomoléculas que constituem as membranas de organelas celulares como, por exemplo: lipídios insaturados, colesterol e aminoácidos. Dado que as membranas celulares desempenham importantes funções biológicas, tais como delinear e organizar os sistemas biológicos, danos em suas estruturas podem levar à destruição do sistema vascular de um tumor ou à inativação de micro-organismos (BONNET, 1995).

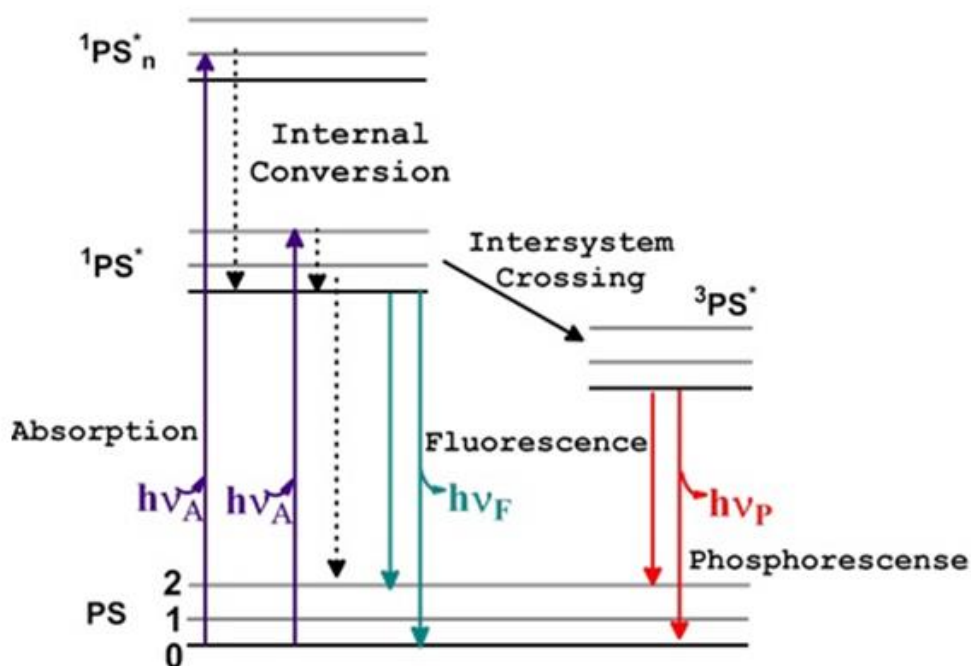


Figura 7: Diagrama de Jablonski modificado (Bonnet, 1995).

3.2. TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOINATIVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

As propriedades terapêuticas da luz são conhecidas há centenas de anos, porém, a terapia fotodinâmica foi desenvolvida apenas no último século (DOLMANS et al., 2003). A fototerapia consiste no uso da luz visível, ou luz próxima ao visível, como agente terapêutico na clínica médica. É dividida em duas categorias: direta, sem utilização de FS e indireta, com utilização de FS, o qual corresponde à molécula responsável por absorver a luz para promoção de um subsequentemente efeito biológico (BONNET, 1995).

A terapia fotodinâmica (TFD) é um processo de dois passos que engloba a administração tópica ou sistêmica de um FS seguida de radiação seletiva da lesão marcada, com luz visível. Há então o início do dano foto-oxidativo e, conseqüentemente, morte celular na área marcada (DOUGHERTY et al., 1998; CALZAVARA-PINTON et al., 2005).

A utilização da terapia fotodinâmica iniciou-se há mais de 4.000 anos quando os egípcios passaram a ingerir plantas contendo psoralenos, juntamente com a

exposição à luz solar para tratar doenças como o vitiligo (STERNBERG; DOLPHIN, 1998).

A TFD é uma modalidade terapêutica minimamente invasiva, clinicamente aprovada para o tratamento de vários tipos de câncer e doenças não oncológicas. Na TFD destinada ao tratamento de tumores, um composto com propriedades fotossensibilizadoras é seletivamente acumulado no tecido maligno. A ativação do FS ocorre pela subsequente radiação de luz visível, preferencialmente na região do vermelho do espectro ($\lambda \geq 600 \text{ nm}$), é então gerado $^1\text{O}_2$, responsável pela citotoxicidade a células neoplásicas e regressão tumoral (JUARRANZ et al., 2008). A região do comprimento de onda na qual se encontram as bandas Q de determinado FS pode refletir seu efeito biológico. São pesquisados novos compostos que apresentem essas bandas deslocadas para comprimentos de onda maiores (próximo ao vermelho) garantindo que haja rendimento apreciável de $^1\text{O}_2$ no tecido (O'CONNOR et al., 2009).

Na dermatologia, a TFD provou ser um tratamento aplicável para uma variedade de tumores malignos e algumas doenças inflamatórias. Além disso, existem estudos para o uso da TFD para tratar doenças dérmicas de origem bacteriana ou viral (CALZAVARA-PINTON et al., 2005). Neste caso, pode-se prever o uso da TFD para combater infecções localizadas de pele, podendo ser utilizada para reduzir a extensão do tecido lesado por alguns micro-organismos e consequentemente, reduzir a área retirada cirurgicamente (HAMBLIN; HASAN, 2004)

A crescente resistência a agentes antimicrobianos renovou a pesquisa por modalidades alternativas de tratamentos de doenças causadas por estes agentes, e a fotoinativação microbiana (FIM) é uma potencial alternativa (LAMBRECHTS et al., 2005; XING et al., 2009; LÓ et al., 2015). Os principais alvos da FIM são as estruturas bacterianas externas, membrana citoplasmática e parede celular (PEREIRA et al., 2014).

A fotossensibilização de micro-organismos pode ter utilidade importante na esterilização, assim como para o tratamento de algumas doenças bacterianas, visto que esta técnica mostrou-se eficiente para a inativação de bactérias Gram positivas e Gram negativas (MINNOCK et al., 1996). Uma aplicação importante envolvendo a FIM ocorre na desinfecção de produtos sanguíneos (WAINWRIGHT et al., 2007; CALZAVARA-PINTON et al., 2005).

3.2.1. Fotossensibilizadores

Fotossensibilizador é um composto químico que provoca alterações físicas ou químicas em outra substância após a absorção de luz. Em 1900 foram descobertos os primeiros compostos a demonstrar este efeito fotodinâmico, a eosina e o alaranjado de acridina. Estes foram testados por Oscar Raab, em paramécios. Durante estes experimentos, foi observada morte celular quando estes foram realizados durante o dia, enquanto não houve morte dos protozoários durante experimentos procedidos no período noturno. Desta maneira, pode-se comprovar a relação da ativação destes compostos pela luz com seu efeito citotóxico (PERUSSI, 2007).

Um FS ideal deve apresentar nível de toxicidade intrínseca (na ausência da luz) baixa ou ausente; região de absorção que coincida com a faixa do espectro visível com maior penetração no tecido; e seletividade às células alvo, para que ocorra a fotoatividade (CASTANO et al., 2004).

Atualmente a TFD utiliza os derivados da hematoporfirina (DHp), os quais são classificados como “fotossensibilizadores de primeira geração”. Photosan®, Photogem® e Photofrin® são algumas das suas denominações comerciais. (O’CONNOR et al., 2009).

A primeira aprovação por agência de saúde para a utilização da TFD, com uso do Photofrin® como FS, foi obtida no Canadá em 1993, para o tratamento profilático de câncer de bexiga. Posteriormente, o FS foi aprovado por outros países para o tratamento de câncer de esôfago, pulmão, sistema gástrico, e coluna cervical (DOUGHERTY et al., 1998).

Apesar de os FSs de primeira geração terem sido objeto de vastos ensaios clínicos e estarem no mercado, eles ainda apresentam alguns problemas. Dentre estes problemas destacam-se a baixa seletividade para com o tecido alvo, fotossensibilidade cutânea durante algumas semanas, fraca fotoativação quando irradiados com luz na região de comprimento de onda do vermelho (na qual a penetração da luz nos tecidos é maior), além de apresentarem-se como uma mistura variável de compostos, não tendo sido possível isolar nem definir o principal ativo (O’CONNOR et al., 2009).

Os FSs de segunda geração vêm sendo pesquisados e utilizados para minimizar os problemas apresentados pelos FSs de primeira geração (SHARMAN et al., 1999), como absorção de comprimento de onda mais elevado, permitindo ação em tecidos mais profundos e produção de menos efeitos adversos, comparados aos FS's de primeira geração (O'CONNOR et al., 2009). Estes FSs compreendem várias classes químicas, começando pela pró-droga ALA (ácido 5-aminolevulínico) - Levulan® que é responsável por transformar a protoporfirina IX presente no organismo em FS. Outros exemplos correspondem aos derivados benzo-porfirínicos como o Visudyne™, derivados da clorina como o Foscan® e derivados da purpurina como o Purytin (ALLISON et al., 2004; SHARMAN et al., 1999).

Além disso, hoje é estudada a conjugação destas moléculas a carreadores, o que caracteriza uma terceira geração destes fotossensibilizadores (O'CONNOR et al., 2009).

3.3. SÍNTESE DE PORFIRINAS

O mundo sintético das porfirinas é extremamente rico e sua história começa em meados de 1930. Uma ampla gama de rotas sintéticas foi descrita e a razão pode ser facilmente entendida pela análise do esqueleto porfirínico. O método mais conhecido para a obtenção de porfirinas se dá através da reação entre pirrol e benzaldeído obtendo-se tetrafenil porfirinas (GIOVANNETTI, 2012).

A primeira referência à síntese de porfirinas *meso*-substituídas deve-se a Rothmund, em 1935, que preparou mais de trinta porfirinas, entre as quais a 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP). Esta síntese foi realizada em condições extremas, através do aquecimento do pirrol e o benzaldeído correspondente, em piridina a 220°C durante 48 horas em condições anaeróbicas. Além disso, era obtido um rendimento de apenas 5% (ROTHERMUND, 1936).

Adler e Longo modificaram a reação de Rothmund visando obter porfirinas por uma reação em condições menos extremas. Desta maneira, foi feita uma reação entre pirrol e benzaldeído sob refluxo, por 30 minutos a 141°C, em ácido propiônico e condições anaeróbicas. Esta reação apresentou rendimento de 20% (ADLER et al., 1967).

Então, em 1987, Lindsey e colaboradores desenvolveram um método, em temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio, utilizando pirrol e aldeído em diclorometano anidro na presença de um catalizador ácido (BF_3 , TFA ou BCl_3), que conduzia à formação do porfirinogênio como intermediário de reação. Tal intermediário podia então ser oxidado à porfirina na presença de DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona) ou *p*-cloranil (tetracloro-1,4-benzoquinona). Essas condições de baixa temperatura conferiram a este método a possibilidade de utilizar aldeídos sensíveis na síntese de porfirinas (LINDSEY et al., 1987).

Desde então, vêm sendo pesquisados métodos para abrandar as condições reacionais e melhorar os rendimentos para a obtenção de porfirinas. Desta maneira, Ló e colaboradores (2011) obtiveram 56% de rendimento na síntese da *meso*-tetrafenilporfirina utilizando-se como catalisador o ácido trifluoreto de boro eterato ($\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$) e como agente oxidante o dióxido de selênio (SeO_2).

3.4. GLICOPORFIRINAS: SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Novos fotossensibilizadores vem sendo pesquisados com a finalidade de aumentar suas eficácias e especificidades, e a utilização de glicoconjugados porfirínicos tem sido uma das estratégias empregadas para este fim (ZHENG et al., 2008). A síntese de glicoporfirinas através da utilização de blocos de dipirrometanos foi realizada por Casiraghi e colaboradores (1994), a qual permitiu a síntese de porfirinas com diferentes substituições por porções glicídicas em suas porções *meso*.

Por sua característica hidrofóbica, as porfirinas tendem a permanecer no organismo após o tratamento, causando efeitos como fotossensibilidade cutânea. Desta maneira, a glicosilação do FS pode diminuir este efeito por aumentar sua hidrofilicidade (ZEHNG et al., 2008). A afinidade do FS à célula-alvo é possivelmente aumentada quando este apresenta características anfifílicas (LAZZERI et al., 2004).

Como as glicoporfirinas apresentam maior hidrossolubilidade em relação a outros compostos porfirínicos, estes glicoconjugados apresentam vantagens farmacotécnicas, podendo ser incorporados a diferentes formas farmacêuticas, além

de apresentar vantagens farmacocinéticas aumentando a velocidade de distribuição e eliminação da droga (JAIN et al., 2012).

Os carboidratos apresentam papéis bem estabelecidos no reconhecimento celular, metabolismo e marcação celular. Sendo assim, o objetivo de usar uma droga glicoconjugada é aumentar a especificidade desta em relação a um tipo celular ou outro tipo de marcador (CHEN et al., 2004). Além disso, a introdução de porções glicídicas à estrutura de compostos porfirínicos aumenta a solubilidade em meio aquoso, facilitando a eliminação da molécula (MIKATA et al., 1998), podendo também direcionar o FS à célula tumoral através da utilização de receptores trans-membrânicos específicos para carboidratos (ZEHNG et al., 2008).

As porfirinas glicosiladas podem ser modificadas de quatro maneiras: 1) alterando o número de moléculas de açúcar, 2) alterando o tipo do sacarídeo, 3) alterando a posição do substituinte e 4) alterando a proteção dos grupos hidroxilas (ZEHNG et al., 2008).

Ló e colaboradores (2013) obtiveram diversos dipirrometanos (Figura 8) ligados à mono e dissacarídeos C-1-desoxialditeos, partindo-se de D-galactose **12**, D-glucose **13**, D-manose **14**, lactose **15** e agarose **16**. Estes compostos foram sintetizados partindo-se de uma etapa de proteção das hidroxilas e função aldeído dos carboidratos (EtSH/HCl–Ac₂O/piridina), resultando em carboidratos dietilditioacetais per-O-acetilados. Os dietilditioacetais peracetilados foram então convertidos em dipirrometanos através da desproteção da carbonila (H₅IO₆, THF–Et₂O), seguindo-se da condensação dos anéis pirrólicos utilizando TFA como catalisador. Esta estratégia sintética proporcionou rendimentos de até 65% para os dipirrometanos, a partir dos derivados dietilditioacetais, e rendimentos globais de até 49%. Esses blocos dipirrometanos estão sendo utilizados, no laboratório onde o presente projeto está sendo desenvolvido, para a obtenção de novos derivados porfirínicos.

Dallagnol e colaboradores (2014) produziram glicoconjugados (Figura 9) utilizando como *linkers* os grupos carbamato **17**, tiocarbamato **18** e tiouréia. Para a obtenção das moléculas, foram empregados tetrafenilporfirinas hidroxiladas ou contendo grupo amino, as quais foram submetidas a reações de adição frente a glicosídeos isotiocianato. Essas reações foram conduzidas sob refluxo, de 24 a 48 horas ou em banho de ultrassom, à temperatura ambiente, por 1 hora. Foi verificado que as reações realizadas com auxílio de ultrassom eram particularmente úteis para

obtenção das glicoporfirinas, mas ineficientes para a obtenção das benzilporfirinas correspondentes.

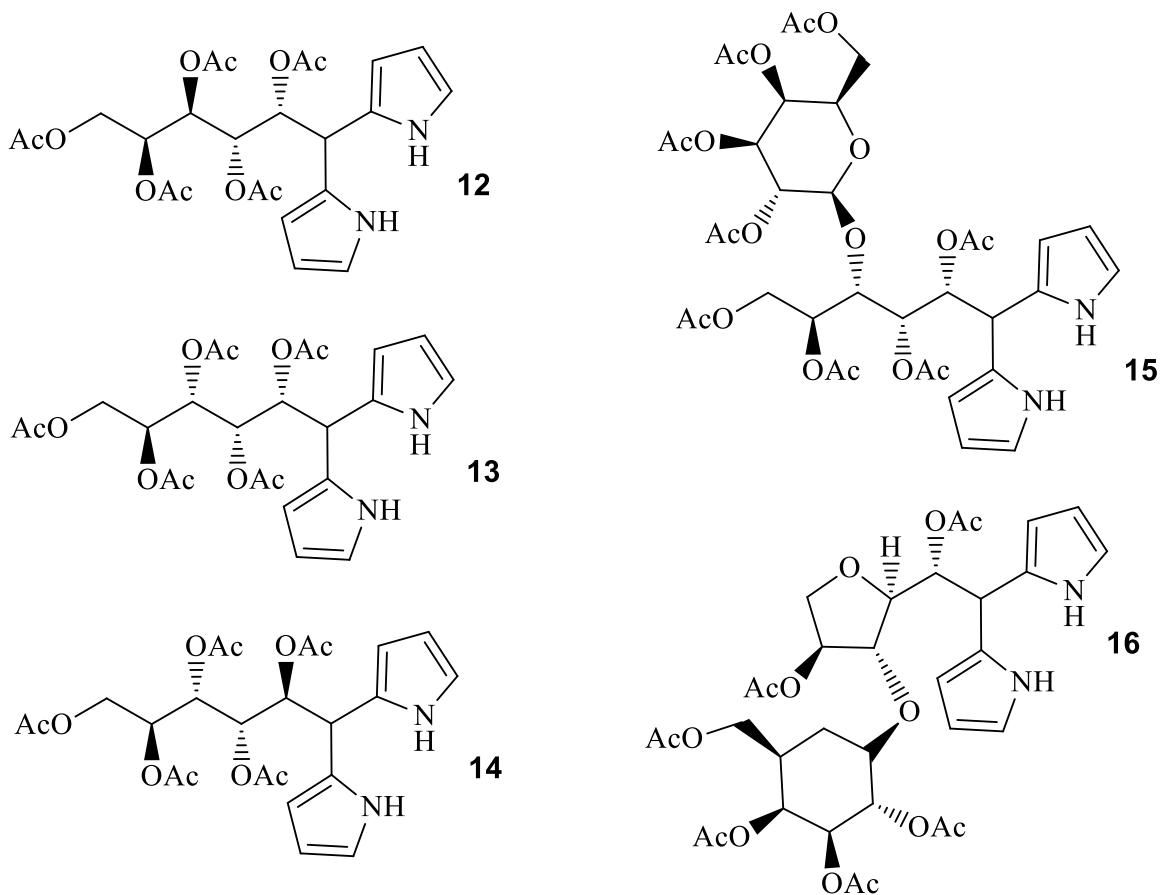


Figura 8: Dipirrometanos derivados da galactose (12), glucose (13), manose (14), lactose (15) e agarose (16) (LÓ et al., 2013).

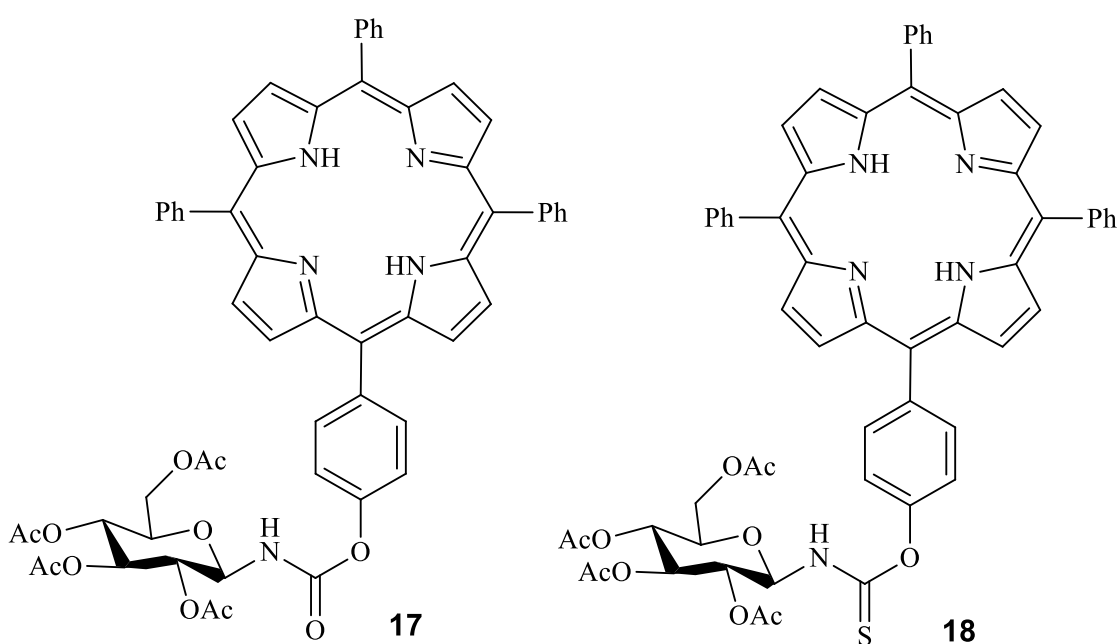


Figura 9: Carbamato **17** e tiocarbamato **18** glicoporfirinas (DALLAGNOL et al., 2014).

A obtenção de glicoporfirinas trissubstituídas, utilizando o grupamento triazol como *linker* foi descrita por Garcia e colaboradores (2011). A síntese destes compostos foi otimizada pela utilização de micro-ondas. Kushwaha e colaboradores (2013), sintetizou dendrímeros com um *core* porfirínico e extremidades contendo 8, 12, 16 e 24 moléculas de β -D-glucopirranose. Os dendrímeros foram formados por grupamentos arila intercalados com grupos triazólicos. Os glicodendrímeros foram obtidos através de moléculas de glucopirranose acetilada, seguindo-se de uma desacetilação com o uso de metóxido de sódio para aumentar a hidrofiliabilidade da molécula. A estrutura adquirida pelas moléculas glicídicas, que permite uma boa solubilidade em água, e o deslocamento da banda Q observado nos testes de absorção, encorajam os estudos para a utilização destas moléculas na TFD.

Ao estudar glicoporfirinas, Mikata e colaboradores (1998), evidenciou que a acetilação das moléculas glicoporfirínicas aumentou a permeabilidade da porfirina na célula, quando comparada à mesma molécula desacetilada.

3.5. CONTROLE DO GRAU DE ACETILAÇÃO DE GLICOCONJUGADOS

3.5.1. Métodos químicos de acetilação e desacetilação de glicídios

A proteção de grupos funcionais é uma técnica amplamente utilizada na síntese orgânica, desta maneira, vários grupos são utilizados para essa função, dentre eles, o grupo acetila, que corresponde ao substituinte mais utilizado como grupo protetor destinado às hidroxilas dos carboidratos. Este tipo de reação tem duas finalidades principais, sendo a proteção total ou parcial destes grupos funcionais.

A proteção total é comumente feita por peracetilação (acetilação total) das hidroxilas para que o carboidrato resultante seja solúvel em solventes orgânicos, facilitando etapas sintéticas ou de purificação posteriores (Esquema 2; obtenção do composto **19** a partir do **1**). As formas mais comuns de acetilação de hidroxilas de carboidratos consistem no uso de anidrido acético, na presença de um catalisador básico, como a piridina ou acetato de sódio (Esquema 2; obtenção dos compostos

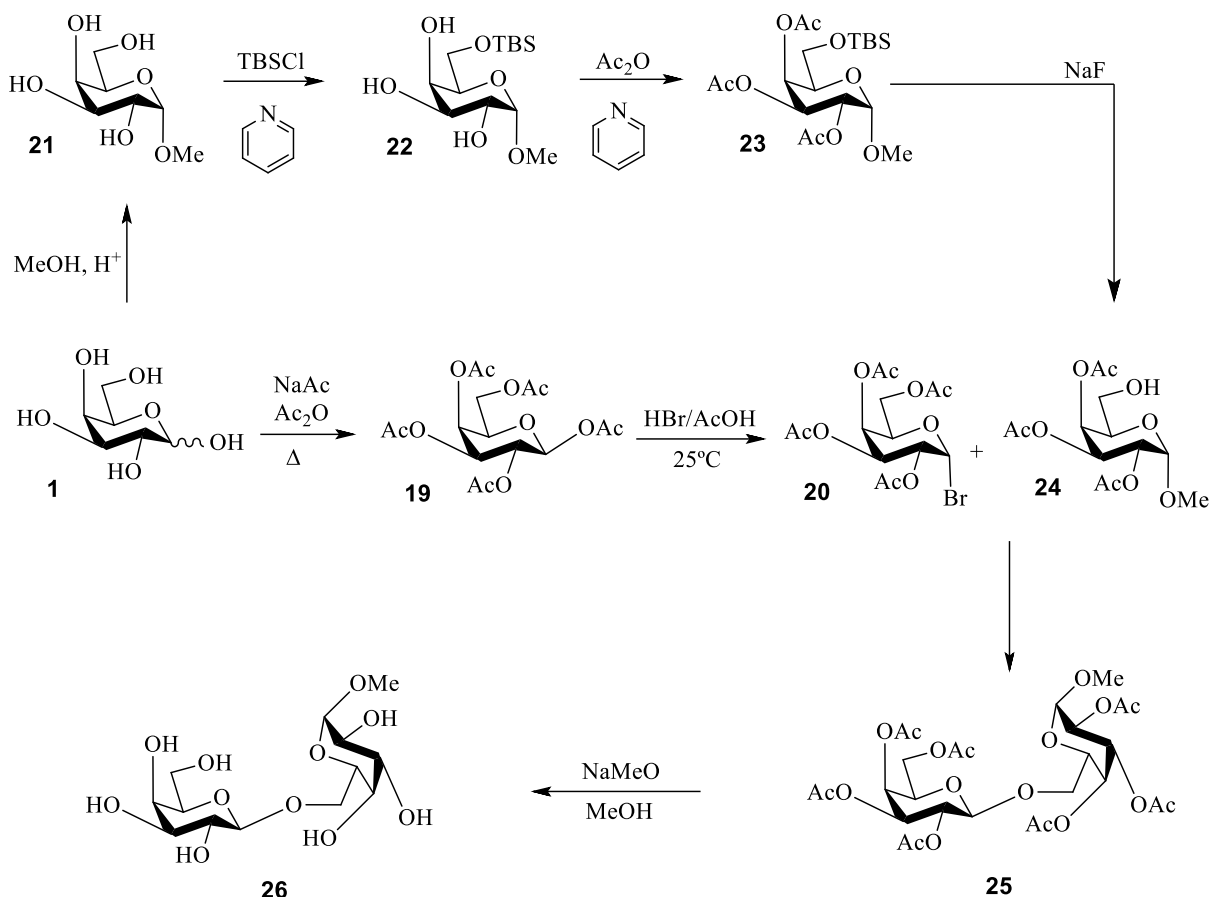
23 e **19**). A obtenção do composto **19**, a partir do composto **1**, assim como a obtenção do composto **23** a partir do composto **22** foi relatada por Michiata e colaboradores (2013), adicionando-se anidrido acético e acetato de sódio sobre a galactose e reagindo por 5 minutos sob refluxo seguida de 10 minutos a TA, com rendimento de 100%. Condições semelhantes foram relatadas por Percec e colaboradores (2013), porém, com rendimento de 47%.

A proteção parcial ou ortogonal das hidroxilas tem o objetivo de manter exposta somente a(s) hidroxila(s) a ser(em) diferencialmente funcionalizada(s) (Esquema 2; obtenção do composto **21** e **22**). Como exemplo de utilização de tais estratégias, pode-se citar a obtenção do composto **21** que foi possível através da reação a TA do açúcar, metanol e ácido (FERNÁNDEZ-HERRERA et al., 2011), ou pela lenta reação em refluxo do açúcar com metanol em HCl, formado *in situ*, pela adição de pequena quantidade de cloreto de tionila em metanol anidro (ABREU et al., 2012). A molécula **22** foi obtida por El-Badri e colaboradores (2007), pela reação entre o açúcar **21** solubilizado em DMF e reagindo o mesmo com TBDMSCI (cloreto de *tert*-butildimetilsilila) e trietilamina, com rendimento de 82%. Belakhov e colaboradores (2004) obtiveram o mesmo composto pela reação com TBDMSCI, piridina e DMAP (4-dimetilaminopiridina).

As etapas finais da rota sintética de um glicoconjugado, a qual envolve acetilação de hidroxilas, invariavelmente consistem na desacetilação das mesmas (Esquema 2; obtenção do composto **26** a partir do composto **25**). Este fato está relacionado com o objetivo principal de se desenvolver uma molécula glicoconjugada: aumento da solubilidade em água e introdução de hidroxilas livres estereoisomericamente orientadas na molécula resultante.

Assim, os métodos mais comuns de desproteção de hidroxilas acetiladas consistem em métodos químicos. Estes se baseiam principalmente na utilização de reações de aminólise, amonólise ou transesterificação promovidas por base, uma vez que grupos O-acetila são moderadamente resistentes a meio ácido. O reagente mais comumente utilizado nestas reações corresponde ao metóxido de sódio solubilizado em metanol seco (Esquema 2; obtenção do composto **26** a partir do composto **25**), como previamente descrito por Kushwaha e colaboradores (2013).

Apesar de ser possível controlar o grau de acetilação ou desacetilação por métodos químicos, é bastante difícil controlar a regiosseletividade destas reações.



Esquema 2: Rota sintética para obtenção do dissacarídeo-metilglicosídeo **26** envolvendo passos de proteção e desproteção das hidroxilas com grupos acetila.

3.5.2. Métodos enzimáticos de acetilação e desacetilação de glicídios

Lipases são enzimas secretadas por muitos fungos e bactérias em meios de cultura. Elas são responsáveis pela hidrólise, assim como pela síntese de acilglicerois, possuindo, desta maneira, importante utilização na biotecnologia, incluindo sua adição a detergentes, ingredientes alimentícios e como biocatalizadores para transformações estereosseletivas. Isto permite que esta classe de enzimas seja amplamente utilizada na química orgânica (JAEGER et al. 1998).

A estrutura das lipases inclui um dobramento α/β -hidrolase (Figura 10), uma tríade catalítica composta de uma serina nucleofílica localizada em um pentapeptídeo (Gly-X-Ser-X-Gly) e um resíduo de aspartato ou glutamato ligado por ligação de hidrogênio a uma histidina. Quatro ligantes para o substrato são identificados para os triglicerídeos: um oxianion e três bolsas que acomodam os

ácidos graxos. A diferença no tamanho e na relação hidrofóbica/hidrofílica, destas bolsas, determina a enantioseletividade da lipase (JAEGER et al. 1998).

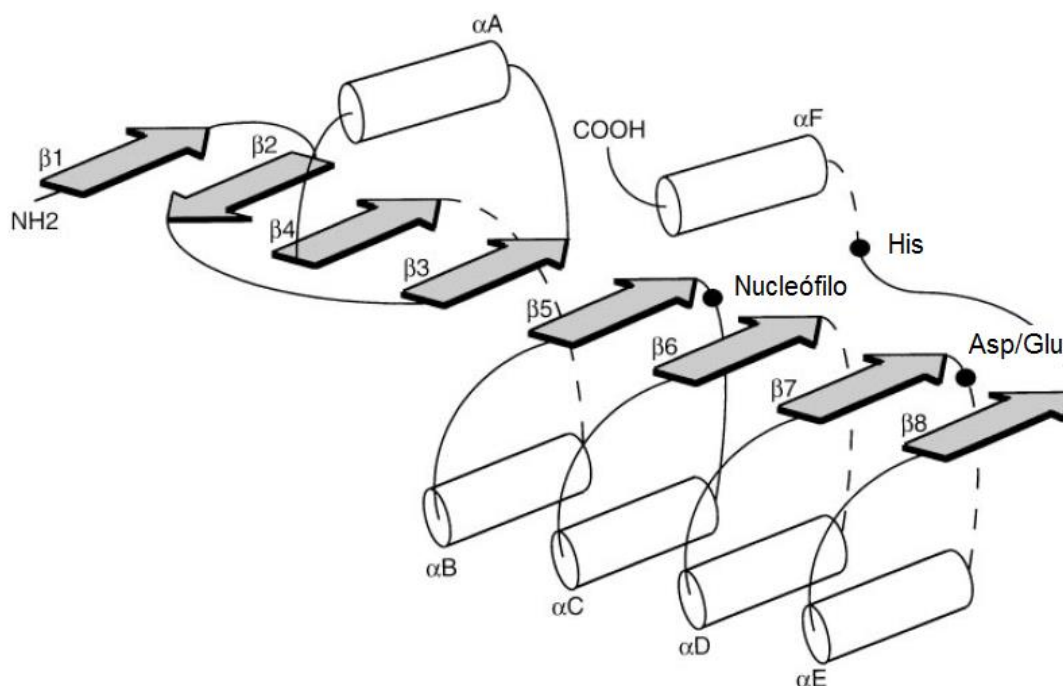


Figura 10: Estrutura genérica de uma α/β -hidrolase. As α hélices são representadas pelos cilindros, e as folhas β são representadas por setas. A posição topológica dos resíduos do sítio ativo é representada pelos círculos sólidos (Nucleófilo, Asp/Glu, His) (Adaptada de OLLIS et al., 1992; JAEGER et al., 1999).

Diferentes tipos de lipases/esterases e proteases apresentam regiosseletividade quando envolvidas em reações de transferência de radicais acetila. Este fato viabiliza a síntese de isômeros de posição que possuem propriedades variadas, as quais podem ser úteis para diversas aplicações. A síntese de moléculas de açúcar com diferentes características de balanço hidrofóbico/hidrofílico pode ser realizada pelo controle do grau de esterificação, o que é possibilitado pelo uso de lipases (PLOU et al., 2002).

Como importante exemplo de lipase utilizada nas reações de síntese orgânica, encontra-se a lipase *Candida antarctica* B (CAL-B) que pertence à classe de enzimas hidrolases (E.C.3). Esta age nas ligações ésteres (E.C.3.1) de ésteres carboxílicos (E.C.3.1.1) e é uma lipase de triacilglicerol (E.C.3.1.1.3) que hidrolisa triacilgliceróis à ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (MAGNUSSON, 2005). É composta por 317 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular de 33 kDa. Não possui a sequência (G-X-S-X-G), comum a esse tipo de lipase, e a sequência que mais se aproxima desta é a que comporta a

Ser105 T-W-S-Q-G, onde a primeira glicina é substituída por uma treonina. É uma proteína α/β globular com as dimensões de 30 Å x 40 Å x 50 Å, como representado na Figura 11. O sítio catalítico é composto pela tríade Ser105, Asp187 e His224 (UPPENBERG, 1994).

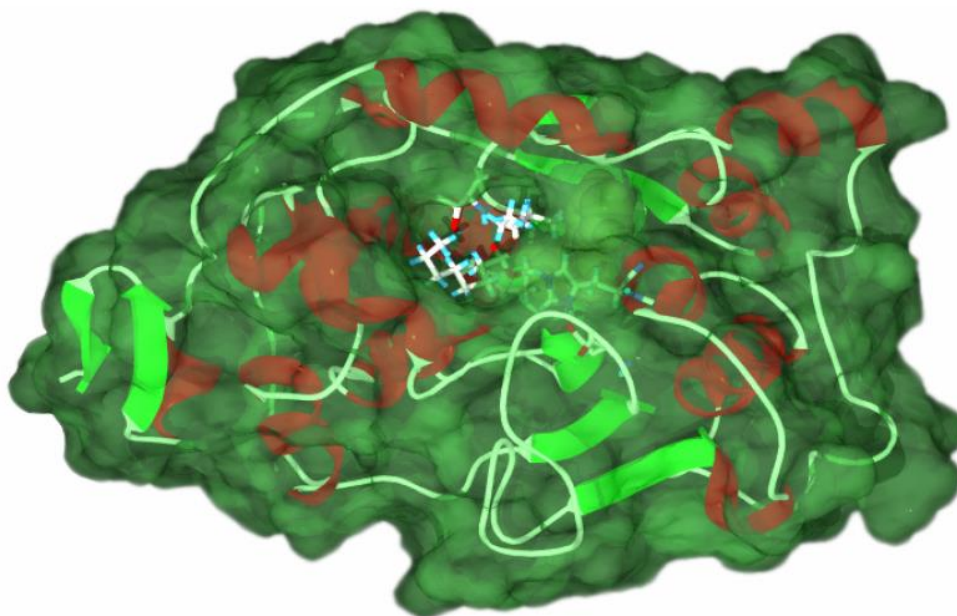
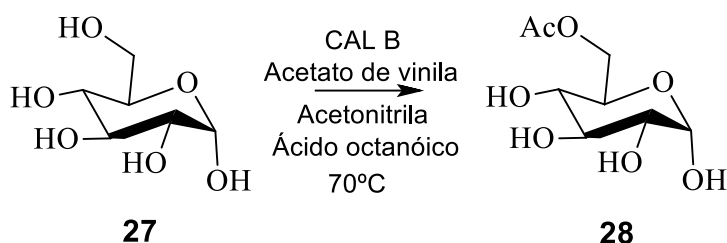


Figura 11: Estrutura da CAL-B pertencente a classe de lipases α/β -hidrolase. As α -hélices estão representadas em vermelho, enquanto as folhas β estão representadas em verde claro e a superfície da enzima em verde escuro. Pode-se visualizar o final do grupamento acila e álcool na entrada do sítio ativo (MAGNUSSON, 2005).

Esta enzima vem sendo utilizada para a resolução cinética de álcoois quirais secundários, tanto na hidrólise quanto na síntese de ésteres. Em muitas dessas reações, a CAL-B apresenta um alto grau de estereosseletividade (UPPENBERG, 1995). Segundo Kazlauskas (1991), a enantiosseletividade de uma enzima está relacionada ao tamanho dos substituintes do substrato, sendo que quando os substituintes do carbono quiral possuem diferença de tamanho, a estereosseletividade é mais expressiva. Uppenberg (1995), sugeriu que o substrato ideal para a hidrólise por CAL-B é um monoéster, estrutura similar ao Tween 80, que possui um álcool e um grupo acila, os quais podem ocupar cada um dos canais do sítio ativo da enzima.

Quando empregada na síntese de ligações éster, a lipase CAL-B possibilita a síntese de hexopiranoses monoacetilados exclusivamente na hidroxila ligada ao C-6 (Esquema 3) (LJUNGER *et al.*, 1994). Foi igualmente evidenciado que lipases como a lipase *Burkholderia cepacia* (WANG *et al.*, 2013), lipases CRL - *Candida rugosa*

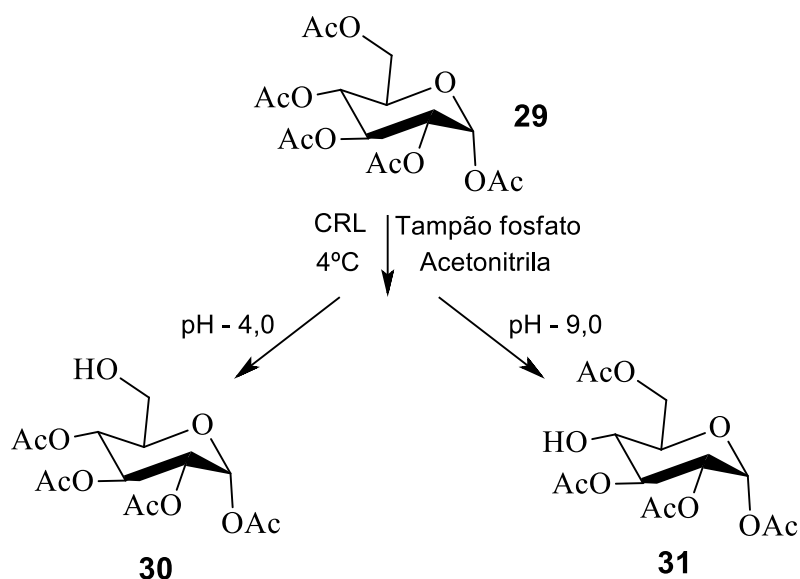
(CIPOLLA et al., 2003; KIM et al., 2003), lipase TLIM - *Thermomyces lanuginosus* (SEBRÃO et al., 2011) apresentam propriedades semelhantes àsquelas encontradas para CAL-B (PRASAD et al., 1995; SHARMA et al., 2009; SEBRÃO et al., 2011).



Esquema 3: Acetilação seletiva promovido pela enzima CAL-B (LJUNGER et al., 1994).

A efetividade da acetilação das moléculas de açúcar depende do tipo de lipase empregada, assim como o solvente e o doador de grupamento acila empregado. O acetato de vinila foi evidenciado como um bom doador de grupo acila (SEBRÃO et al., 2011).

Outro exemplo de lipase utilizada em síntese orgânica são as lipases de *Candida rugosa* (CRL), as quais tem a propriedade de desacetilar regioseletivamente a posição C-6 de hexopiranosos peracetilados, (Esquema 4) (ESMURZIEV et al., 2009, TERRINI et al., 2002). Além disso, segundo Terrini e colaboradores (2002) foi possível obter uma desacetilação regioseletiva em C-4 quando o procedimento de hidrólise foi realizado em pH básico.



Esquema 4: Desacetilação promovida pela enzima CRL em diferentes pHs (TERRINI et al., 2002).

Outras enzimas apresentaram atividades semelhantes à da CRL (TERRINI et al., 2002; HIETANEN et al., 2012), como a lipase PFL - *Pseudomonas fluorescens* (TERRINI et al., 2002), lipase TLIM - *Thermomyces lanuginosus* (SHARMA et al., 2009; HIETANEN et al., 2012), lipases de *Burkholderia cepacia*, lipase CAL-A – *Candida antarctica* A (HIETANEN et al., 2012), e lipase CAL-B – *Candida antarctica* B (GARCIA et al., 2002; PRASAD et al., 2006; SINGH et al., 2011; HIETANEN et al., 2012; SHARMA et al., 2014).

Adicionalmente, segundo Sebrão e colaboradores (2011), foi possível recuperar e reutilizar as lipases em diversas reações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MÉTODOS GERAIS

4.1.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) em escala analítica foi realizada utilizando sílica ou óxido de alumínio como fase estacionária e misturas de solventes (p.a.) preparadas em diferentes proporções (v/v) como fase móvel (FM). Para execução da técnica foram utilizadas folhas de alumínio revestidas por sílica gel 60 (4 cm de altura e largura variável, dependendo do número de amostras a serem analisadas).

A revelação de compostos glicosilados foi feita através da imersão da placa em solução de Orcinol 0,5% em etanol/ H_2SO_4 (20:1) e aquecimento, enquanto as substâncias que apresentam coloração não necessitaram de revelador.

A CCD semi-preparativa foi realizada especificamente com o objetivo de analisar as bandas cromatográficas por espectrometria de massas (MALDI-TOF). Para tal, foram utilizadas placas de alumínio revestidas com sílica, maiores que as utilizadas para a CCD analítica (4 x 6 cm), onde a amostra foi aplicada na forma justaposta, com o objetivo de se alcançar quantidade de material suficiente que permitisse a análise por MALDI-TOF.

Após a eluição, as bandas desejadas para análise foram excisadas com auxílio de espátula de alumínio, e o conteúdo referente às excisões foi transferido para ependorff. O material da excisão foi extraído com solvente adequado e então analisado conforme descrito no item 4.1.4.1.

A CCD preparativa foi realizada com o objetivo de separação de compostos com R_f muito próximos que, por este motivo, não podiam ser separados adequadamente por coluna cromatográfica. Foi realizada em placas de vidro (20 x 20 cm) revestidas com sílica gel 60 G, neutralizada, para cromatografia em camada delgada (55 μm) (Merck). A aplicação do material na placa cromatográfica foi realizada com auxílio de pipeta pasteur. Após a eluição da placa com solvente

adequado, as bandas correspondentes às substâncias desejadas foram excisadas com auxílio de espátula, extraídas com solvente adequado e secas sob vácuo.

4.1.2. Coluna cromatográfica sob pressão (*dry flash chromatography*)

Para a separação preparativa dos produtos de reação foram utilizadas colunas cromatográficas de sílica gel grau CCD 60 (220-240 mesh) (Merck). A quantidade de sílica e as dimensões da coluna foram selecionadas de acordo com a relação descrita por Still, Kahn e Mitra (1978). Para aumentar a eficiência da separação com a utilização de sílica, esta foi ativada por 2 horas a 100°C. O método consiste na separação das substâncias, considerando sua polaridade e afinidade pela sílica, utilizando fases móveis constituídas por diferentes solventes. Foi realizado o acompanhamento da separação dos produtos através de CCD analítica. A purificação das porfirinas foi alternativamente realizada em coluna de alumina (diâmetro do poro 58 Å, pH 7,0-7,5) (Sigma-Aldrich).

4.1.3. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos com auxílio dos espectrômetros BRUKER DPX 200 e BRUKER Avance DRX 400 operando nas frequências de 200,1 ou 400,1 MHz para os núcleos de ^1H e 50 ou 100,63 MHz para os núcleos de ^{13}C , para os respectivos equipamentos.

Experimentos bidimensionais de COSY (*Correlation Spectroscopy*), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) também foram realizados quando necessários.

As atribuições dos sinais e as magnitudes das constantes de acoplamento foram obtidas a partir dos espectros de RMN de ^1H através de análises de primeira ordem. A aparência dos sinais é indicada pelas abreviaturas l, s, d, t, q, e m para largo, simpleto, duplete, tripleto, quarteto e multiplete respectivamente.

As amostras foram solubilizadas em solvente deuterado apropriado, e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro para análise a temperatura de 30°C, no caso das porfirinas, o experimento foi realizado a 70°C.

Os deslocamentos químicos, expressos em ppm foram determinados utilizando como padrão interno o Me₄Si (0,00 ppm para ¹H e ¹³C). O sinal central, dos solventes deuterados utilizados, também foi usado como referência: CDCl₃ (7,27 ppm e 77,23 ppm, ¹H e ¹³C, respectivamente); DMSO-d₆ (2,51 e 39,50 ppm, ¹H e ¹³C, respectivamente); CD₃OD (3,31 ppm e 49,1 ppm, ¹H e ¹³C, respectivamente) (GOTTlieb et al., 1997). Os espectros foram analisados com auxílio do programa TOPSPIN 3.1.

4.1.4. Espectrometria de massas

4.1.4.1. Ionização por dessorção de matriz assistida por laser acoplada a analisador de massas por tempo de voo (MALDI-TOF).

Os espectros de massas foram obtidos com o espectrômetro MALDI-TOF/MS modelo Autoflex II (Bruker Daltonics). O programa utilizado foi o FlexControl 2.0 (Bruker Daltonics). Os espectros foram obtidos no modo refletor positivo, com voltagem de aceleração de 20 kV, intervalo de 150 ns entre o pulso de laser e aplicação de voltagem, e a faixa de aquisição entre 500–2000 Da. A análise e tratamento dos espectros foram feitos utilizando-se o programa FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics). A matriz HCCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico) foi previamente adicionada nas amostras para realização destas análises.

4.1.4.2. Ionização por *eletrospray* acoplada à espectrometria de massas (ESI-MS)

Para a verificação da massa exata dos compostos obtidos, foi utilizado o espectrômetro de massas com analisador quadrupolo-tempo de vôle, Xevo G2-S, (Waters) com fonte de ionização por *eletrospray*. O nitrogênio de alta pureza utilizado como gás do cone e de dessolvatação foi produzido por um gerador de nitrogênio (Peak Scientific Instruments). O gás de colisão utilizado foi argônio com pureza >99,998% (White Martins Praxair Inc.).

O modo positivo de ionização foi escolhido uma vez que os analitos apresentam grupos funcionais que facilmente aceitam um próton, H^+ , como aminas, amidas e ésteres.

A checagem da calibração do equipamento foi feita utilizando como calibrante formiato de sódio 0,05 mmol/L produzido a partir de hidróxido de sódio (Merck) e ácido fórmico (Merck).

As amostras foram preparadas solubilizando os compostos em DMSO (1 mmol/mL) e posteriormente preparando soluções 1 µg/mL em metanol:água (8:2). As soluções foram introduzidas no espectrômetro por infusão direta, em fluxo de 20 µL/min, a fim de obter a massa exata dos compostos sintetizados.

A partir disso, foi feita a otimização dos parâmetros da fonte de ionização, tendo sido definidas as seguintes condições:

- Voltagem do capilar: +3,50 kV;
- Voltagem do cone: 40 V;
- *Source offset*: 80 V;
- Temperatura da fonte: 150°C;
- Temperatura de dessolvatação: 300°C;
- Gás do cone: 50 L/h;
- Gás de dessolvatação: 600 L/h;
- Tempo de aquisição dos dados: 2 minutos.

No decorrer da corrida analítica, as massas adquiridas foram corrigidas por meio do *Lockspray*, composto por leucina+encefalina na concentração de 1000 ng/mL e com fluxo de 20 µL/min.

Os dados obtidos foram processados por meio dos *softwares* MassLynx V 4.1 e foram adquiridos no modo centroide em MS. A faixa de leitura de massas foi estabelecida com base nas massas dos analitos, sendo definido o intervalo entre 500 a 1200 *m/z*.

Para verificar a exatidão do resultado, foi calculado o erro, com base na equação 1, apresentada a seguir, sendo considerado um erro aceitável 5 ppm (IGLESSIAS, 2012).

$$\text{Erro em ppm} = \frac{(|\text{massa real} - \text{massa medida}|)}{\text{massa real}} \times 10^6 \quad \text{Equação 1}$$

4.1.5. Espectrometria na região do ultravioleta-visível

Para realização das análises de UV-Vis, as amostras foram diluídas na concentração de 12 µg/mL em DMSO. Os espectros de UV-visível foram obtidos no espectrofotômetro 8453 UV-Visible Spectroscopy System (Agilent) no modo varredura 350-800 nm.

4.2. SÍNTESES

Após determinação das estruturas químicas a serem sintetizadas, foi realizada uma busca das alternativas sintéticas em bases de dados como Reaxys® e SciFinder®, entre outras. Desta maneira, foi planejada a rota sintética a ser realizada (Esquema 1 – página 21).

Os métodos utilizados para a síntese dos compostos estão descritos na seção anexos (página 108), assim como a caracterização dos compostos obtidos.

4.2.1. Reações enzimáticas

As reações enzimáticas foram realizadas com a utilização de algumas enzimas disponibilizadas pelo laboratório NPDEAS (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto Sustentável - UFPR). Desta maneira, foram utilizadas seis lipases comerciais imobilizadas: lipase de *Candida antarctica B* (CAL-B) Novozymes®, lipase de *Mucor miehei* (Lipozyme RMIM) Novozymes®, lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TLIM) Novozymes®, lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipolase 100T) Nordisk®, lipase de *Candida cylindracea* (CCL) Fluka®. Além disso, foi utilizada uma lipase não comercial, imobilizada no NPDEAS, lipase de *Rhizopus oryzae*, imobilizada em Accurel MP-1000 e uma amilase comercial α -amilase de *Bacillus licheniformis* (Termamyl 120T) Novozymes®.

As condições reacionais foram delineadas baseando-se em literatura pesquisada em bases de dados como Reaxys® e SciFinder®, com posterior otimização das reações. Estas condições estão descritas na seção anexos (página 108).

4.3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.3.1. Atividade de hidrólise enzimática em meio aquoso

A determinação da atividade de hidrólise foi realizada adicionando-se a enzima diretamente ao meio reacional, com base no método titulométrico proposto por Tiss, Carriere e Verger (2001), em titulador automático do tipo pH-STAT da Metrohm, modelo 718 Stat Titrino (Herisau, Appenzell, Suíça). O método consiste na titulação com NaOH (0,05 mol/L) dos ácidos graxos liberados pela ação das lipases sobre os triacilgliceróis.

Para todos os ensaios, foi preparada uma emulsão com goma arábica 3% (m/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2 mmol/L), tampão Tris-HCl (2,5 mmol/L, pH 7,0) e NaCl (150 mmol/L) (TISS, CARRIERE e VERGER, 2001). A esta emulsão se adicionou o

substrato óleo de oliva (67 mmol/L, extra-virgem, GALLO®). Esta mistura foi homogeneizada durante 5 min em liquidificador. A enzima, em quantidades variáveis (2–80 mg), foi adicionada em 20 mL de emulsão, em frasco com capacidade de 50 mL e aquecido a temperaturas variadas (25-50°C), sob agitação magnética (300 rpm). O meio reacional foi ajustado para pH 7,0 por titulação no próprio frasco do equipamento e as reações foram conduzidas por 3 min. Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a produção de um μmol de ácidos graxos por min nas condições do ensaio. Para a enzima imobilizada, a atividade é expressa como unidades de atividade por grama de enzima (U/g).

A atividade de hidrólise (A_H) foi calculada com a Equação 2.

$$A_H = \frac{\frac{dV}{dt} \cdot [\text{NaOH}] \cdot f \cdot F_{pH}}{M_{SF}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: dV/dt é a velocidade inicial do consumo de NaOH em mL/min; $[\text{NaOH}]$ é a concentração de NaOH em $\mu\text{mol/mL}$; f é o fator de correção da solução de NaOH padronizada (adimensional); M_{SF} é a quantidade de enzima em g e F_{pH} é o fator de correção (adimensional) relacionado à dissociação parcial dos ácidos graxos do óleo de oliva, que possui um valor de pK_a de 6,8. O valor de F_{pH} foi calculado com a Equação 3, considerando o pH do ensaio (7,0).

$$F_{pH} = \frac{1 + 10^{(pH - pK_a)}}{10^{(pH - pK_a)}} \quad \text{Equação 3}$$

Os resultados foram obtidos através do programa analisador VESUV – Datalogger que gera um gráfico relacionando o volume da solução de NaOH (mL) pelo tempo (s), e a atividade enzimática é dada em ($\mu\text{mol/min}$).

4.3.2. Atividade de hidrólise enzimática em meio orgânico

O método Lowry e Tinsley, adotado neste trabalho para a determinação da atividade enzimática em meio orgânico, foi baseado na reação colorimétrica entre os

ácidos graxos livres e um reagente de cor a base de cobre. O complexo formado foi então extraído com solvente orgânico e a intensidade de cor foi medida por espectrofotometria (STOYTCHEVA et al., 2012).

4.3.2.1. Preparo do reativo de cor

A solução aquosa de acetato de cobre II 5 % (m/v) foi preparada pela adição de 25 g de acetato de cobre II a 500 mL de água, e mantidos sob agitação por 1 hora. Após solubilização, a solução foi filtrada e o pH ajustado para 6,0 com pirimidina.

4.3.2.2. Curva de calibração

Para a análise dos resultados, construiu-se uma curva de calibração utilizando o reativo de cor e diferentes concentrações de ácido oleico. Para isso foi preparada uma solução de ácido oleico em hexano e esta foi adicionada a um volume fixo do reativo de cor, nas quantidades de 0, 20, 40, 60, 80 e 100 mmol de ácido oleico. As absorbâncias em 715 nm foram obtidas pelo espectrofotômetro Shimadzu UV-spectrophotometer UV-1800. Foi então plotada uma curva de calibração (absorbância x concentração de ácido oléico) e a partir desta curva de calibração, foi possível determinar a atividade enzimática hidrolítica das lipases utilizadas.

4.3.2.3. Método

Foi preparado um meio reacional contendo 70 mmol de trioleína em 28 mL de hexano, sendo o mesmo aliquotado em frações de 4,9 mL em dois erlenmeyers, sendo que um deles foi utilizado como branco o outro como teste. Foi adicionado

0,1 mL (2 %) de água aos dois erlenmeyers e 30 mg de enzima no frasco teste no início da reação.

Os dois erlenmeyers foram colocados em *shaker* para reagir a uma temperatura de 30°C por 2 horas.

Foram coletadas alíquotas de 100 µL dos dois meios reacionais nos tempos 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 120 minutos e transferidas para ependorff contendo 250 µL do reativo de cor e 1,5 mL de tolueno.

O conteúdo dos ependorffs foi homogeneizado por 30 segundos com auxílio de vortex e então foi medida a absorbância em 715 nm da fração orgânica neles contida.

O resultado foi obtido pela determinação da concentração de ácido oleico utilizando a curva de calibração (absorbância x concentração de ácido oléico) e a construção do gráfico tempo (minutos) x concentração de ácido oleico (µmol).

4.4. ENSAIOS FOTOFÍSICOS

Para a realização dos ensaios fotofísicos foram utilizadas soluções estoque das porfirinas analisadas, previamente preparadas, na concentração 1 mmol/L em DMSO.

4.4.1. Fotoestabilidade de porfirinas

Os experimentos para a verificação da fotoestabilidade das porfirinas sintetizadas seguiram a metodologia empregada por Gomes e colaboradores (2011).

Para o estudo da fotoestabilidade, foi utilizado 2 mL de solução aquosa do derivado porfirínico em questão, obtida a partir das soluções estoque previamente preparadas. A concentração das soluções variou de 4 e 10 µmol/L, visando obter a absorbância da banda de Soret com intensidade entre 0,7 e 1,0.

Os experimentos consistiram em medir a intensidade da banda de Soret dos derivados porfirínicos em tempos especificados na presença, ou não de irradiação.

Para tal, as absorbâncias foram mensuradas no modo varredura (entre 350–800 nm) com auxílio de espectrometro de UV-visível, 8453 UV-Visible Spectroscopy System (Agilent), nos tempos (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 20 e 30 min) sendo os experimentos realizados em triplicata, primeiramente na ausência de luz, e posteriormente com as amostras submetidas à irradiação.

Para os estudos na presença de luz, as soluções foram mantidas sob agitação e submetidas a irradiações de intensidade luminosa de 100 mW/cm^2 , promovida pela utilização da lâmpada LUMACARE®, para obtenção desta intensidade luminosa específica, a lâmpada foi posicionada a 82 mm da amostra.

A interpretação dos dados foi realizada com o auxílio do programa UV-Visible ChemStation Software.

4.4.2. Produção de oxigênio singleto

Os experimentos para verificar a geração de oxigênio singleto seguiram a metodologia descrita por Hadjur e colaboradores (1998). Imediatamente antes da análise foram preparadas duas soluções: uma contendo os derivados porfirínicos na concentração de 0,1 mmol/L dissolvidos em DMF:água (9:1) e outra contendo o composto 1,3-difenilisobenzofurano (DFiBF) na concentração de 10 mmol/L em DMSO. Em células de vidro, foram então preparados 2 mL de solução contendo DFiBF 50 $\mu\text{mol/L}$ e porfirina 0,5 $\mu\text{mol/L}$, em DMF/H₂O 9:1.

As células foram então irradiadas com luz na intensidade de $9,0 \text{ mW/cm}^2$ e comprimento de onda na faixa de 550–800 nm. Para obter esta intensidade luminosa e comprimento de onda, foi utilizada a lâmpada LUMACARE®, posicionada a 243 mm de distância da amostra, e foram posicionados dois filtros (B e C) entre a amostra (D) e a fonte luminosa (A) (Figura 12). Durante a irradiação, as soluções foram mantidas sob agitação magnética a temperatura ambiente (25° C).

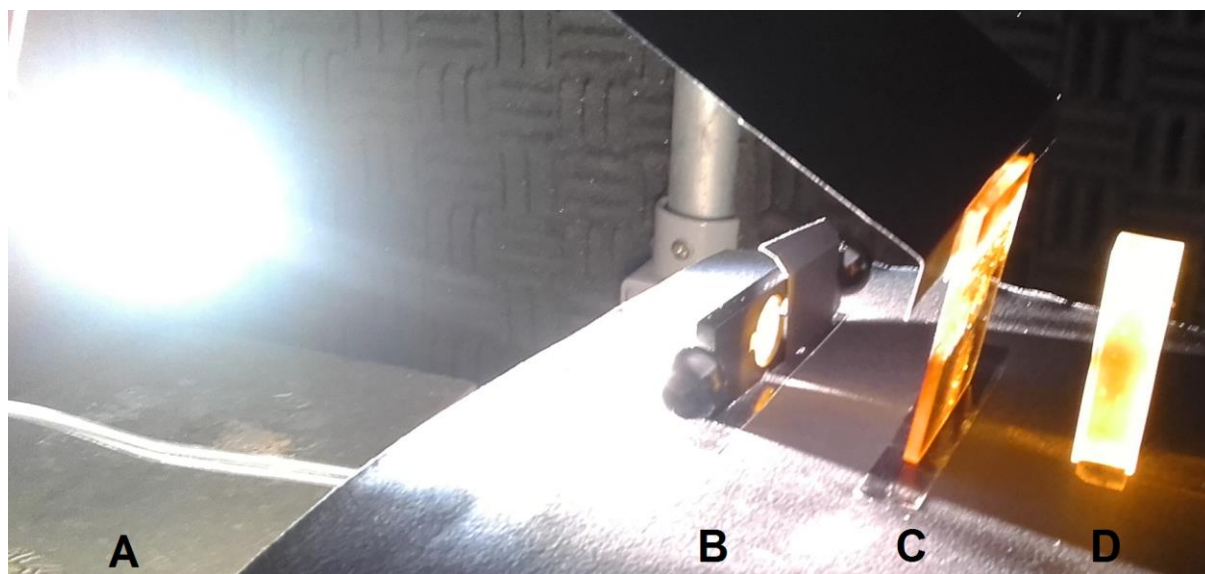


Figura 12: Posicionamento da LUMACARE® e filtros para obtenção de intensidade de luz de $9,0 \text{ mW/cm}^2$ e comprimento de onda na faixa de 550–800 nm.

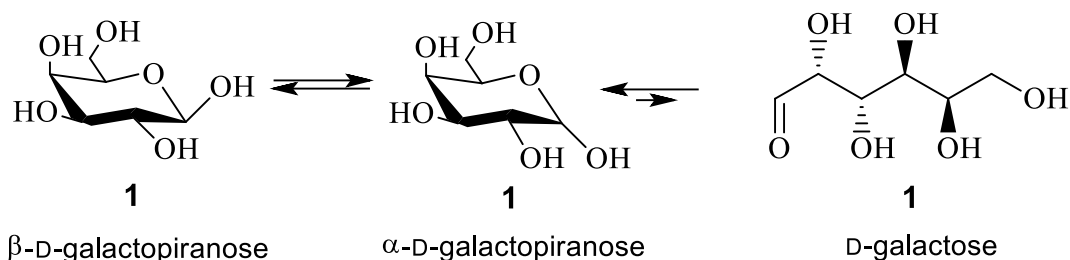
A absorbância foi medida em 415 nm com o auxílio de espectrofotômetro 8453 UV-Visible Spectroscopy System (Agilent), a cada minuto durante os 15 minutos iniciais e, posteriormente, após 20 e 30 minutos de irradiação. A porcentagem de redução, proporcional à produção de oxigênio singlete, foi calculada por comparação entre a absorbância inicial da solução ao tempo zero e a absorbância registrada ao fim de cada período de irradiação avaliado. A interpretação dos dados foi realizada com o auxílio do programa UV-Visible ChemStation Software.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OBTENÇÃO DA PORFIRINA (5)

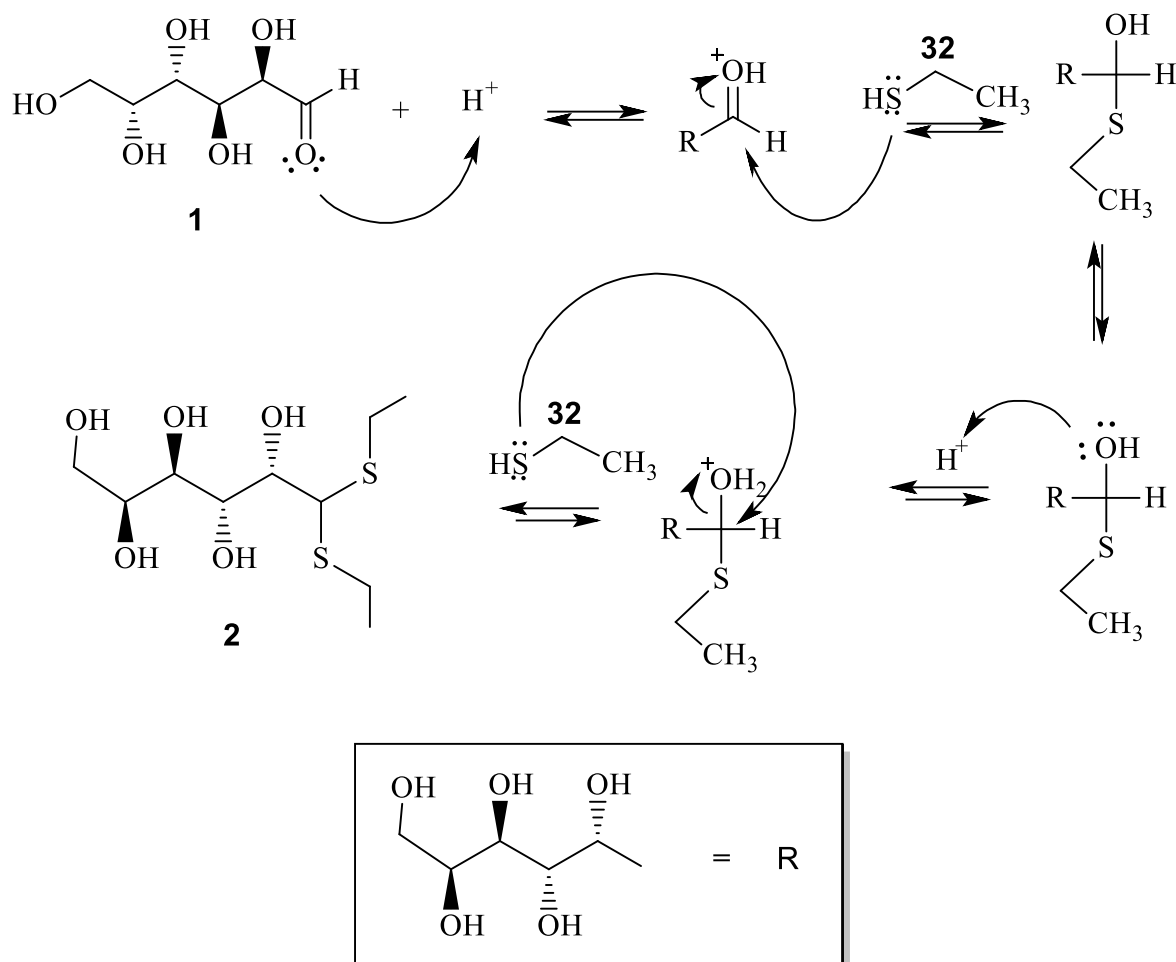
A primeira etapa do trabalho consistiu em obter o composto **5** (Esquema 9 - página 56) (5,15-[bis(fenil)]-10,20-[bis(1-desoxi)-2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-galactitol]porfirina) que foi a base para as reações de desacetilação propostas no presente trabalho. O composto **5** foi obtido através de quatro etapas, partindo-se da galactose **1**, pirrol **34** e benzaldeído **35**.

A galactose **1** em solução apresenta-se em sua forma cíclica (galactopirranose) em maior proporção. Porém, em uma pequena quantidade, esta apresenta-se na forma aldeídica, conforme representado no Esquema 5. Apesar de minoritária, a forma aldeído de cadeia aberta corresponde a espécie que é consumida na reação de obtenção do composto **2** (Esquema 6 – página 53).



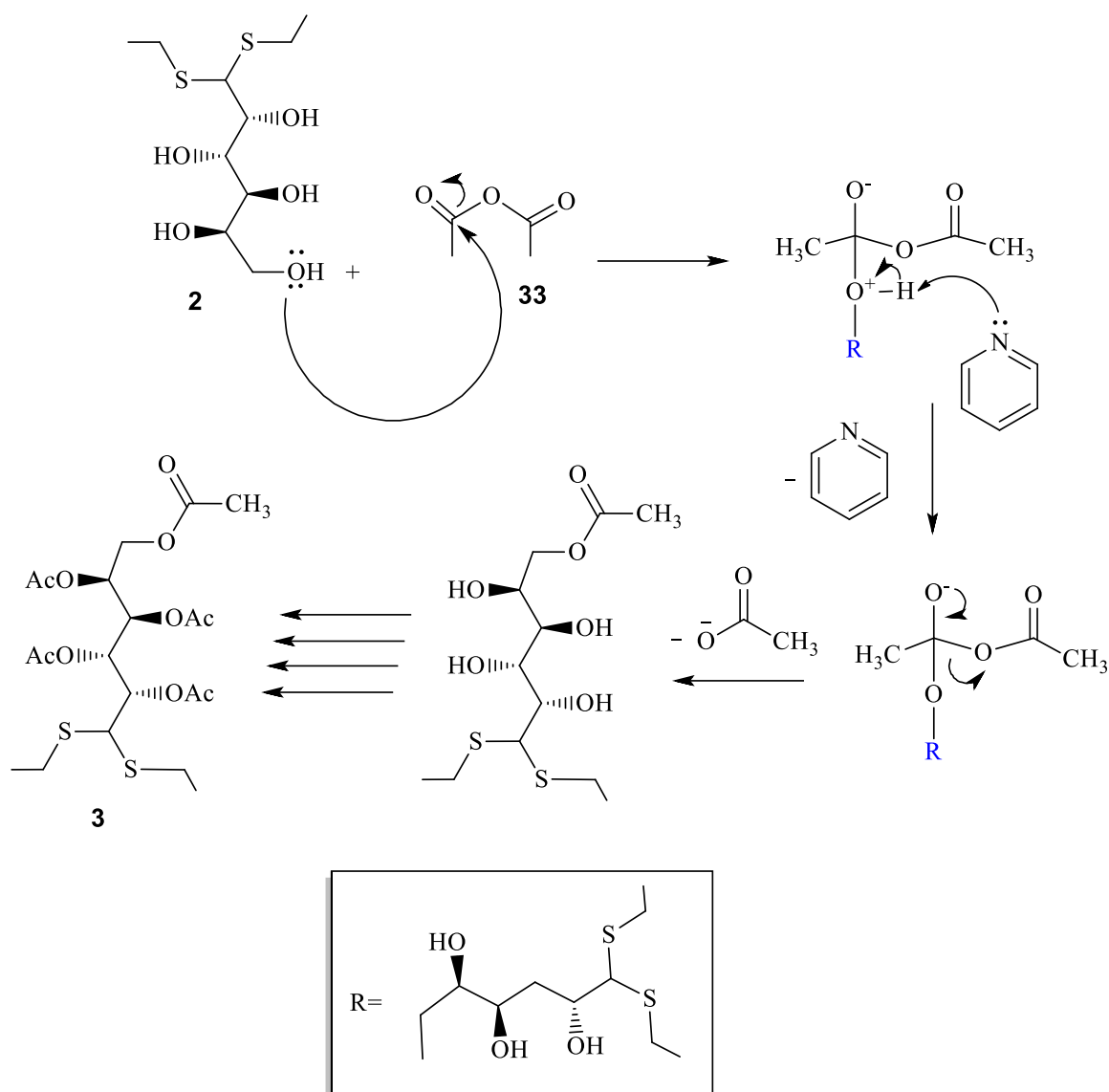
Esquema 5: Equilíbrio entre a forma cíclica e a forma aldeídica da galactose.

Para que o composto **5** fosse obtido com sucesso, primeiramente a galactose **1**, em sua forma aldeídica, foi submetida a dois tipos diferentes de proteção. A primeira proteção foi feita pela reação com etanotiol **32**, que permitiu a adição de dois equivalentes de etanotiol **32** à porção aldeído do açúcar, como representado mecanisticamente no Esquema 6. A partir desta reação, o composto **2** foi obtido com rendimento de 71%, sendo assim possível manter o grupo aldeído protegido nas primeiras etapas da síntese (para detalhamento experimental e dados espectrais, ver Anexo 1 página 110).



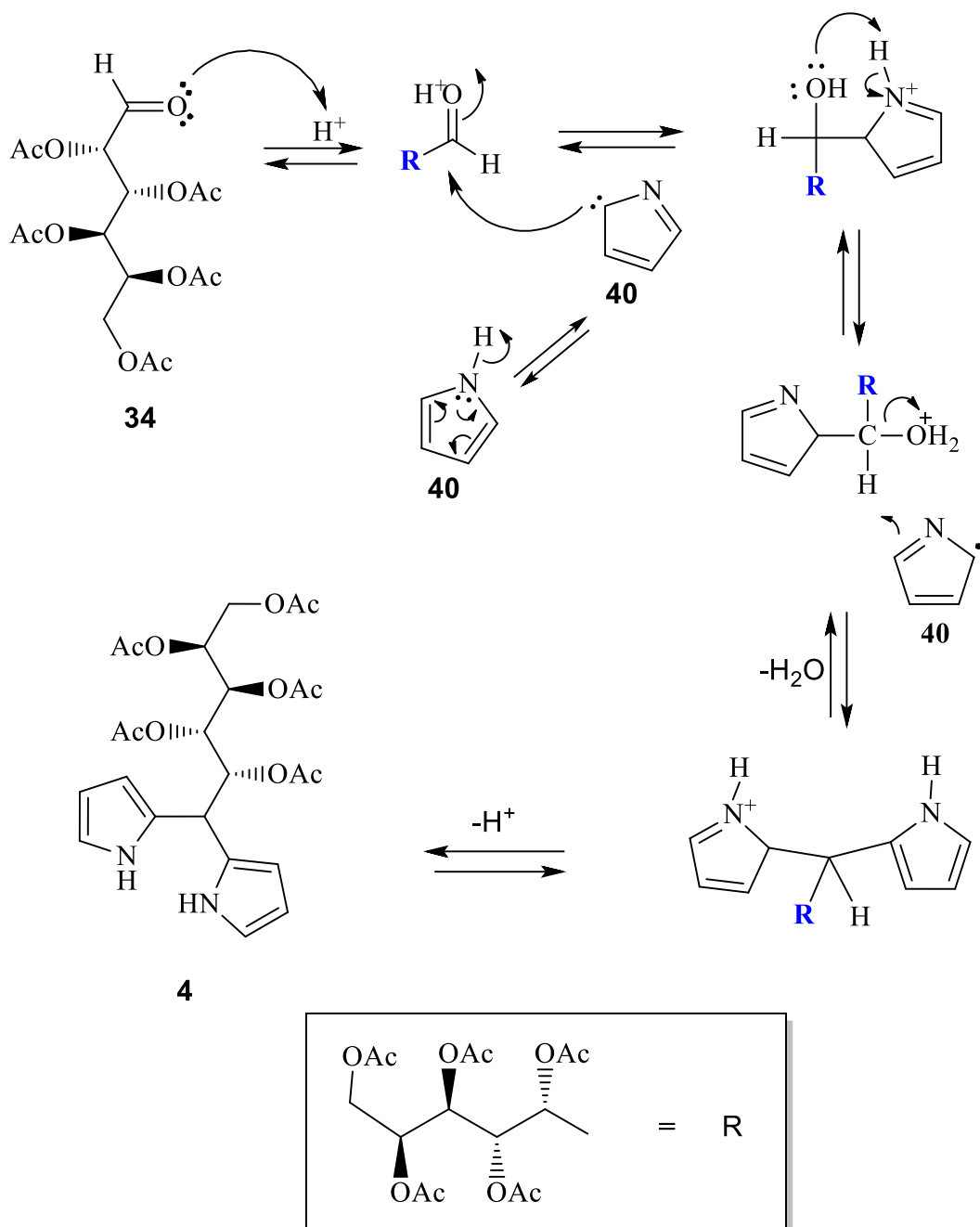
Esquema 6: Mecanismo de reação para a formação da galactose dietilditioacetal (2).

A segunda proteção foi realizada para impedir que as hidroxilas do açúcar reagissem durante as demais etapas até a obtenção da porfirina desejada, bem como para tornar os intermediários de síntese solúveis em solventes orgânicos. Esta proteção foi realizada pela reação do composto **2** com anidrido acético **33** em meio levemente básico, o que levou a acetilação das hidroxilas, originando o composto **3** com rendimento de 98% (para detalhamento experimental e dados espectrais, ver Anexo 2 página 112). O mecanismo desta reação está representado no Esquema 7.



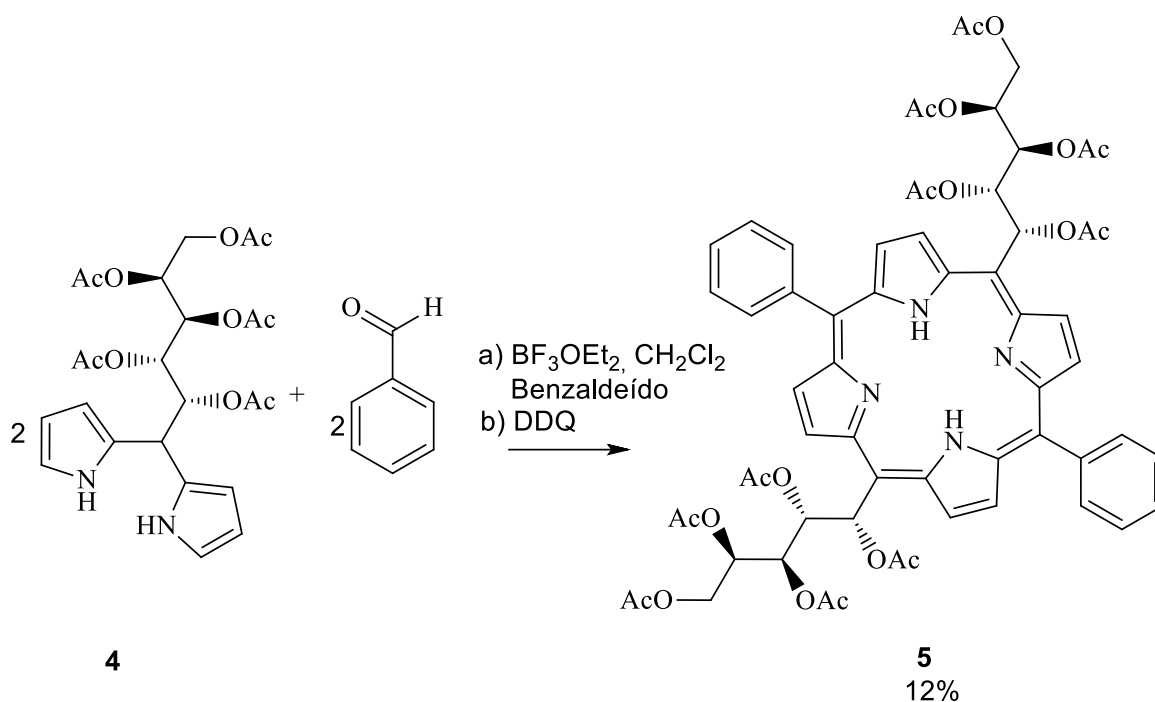
Esquema 7: Mecanismo de reação para a formação do 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-galactose dietilditioacetal (**3**).

De acordo com os objetivos do presente trabalho, os quais envolvem a utilização de intermediários dipirrometanos para a obtenção de derivados porfirínicos, foi sintetizado o composto **4**. Esta reação foi possível após a desproteção do grupamento aldeído do açúcar e a reação deste com pirrol **34**, em meio ácido (para detalhamento experimental e dados espectrais, ver Anexo 3 - página 114). Esta reação, que apresentou rendimento de 45%, ocorre conforme mecanismo apresentado no Esquema 8.



Esquema 8: Mecanismo de reação para a formação do 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-1-desoxi-1,1-dipirril-D-galactitol (**4**).

A porfirina **5** foi obtida a partir da reação entre o dipirrometano **4** e benzaldeído **35**, como representado no Esquema 9, em uma reação de duas etapas. A primeira etapa permitiu a formação do porfirinogênio correspondente, que foi então oxidado (segunda etapa) com a utilização de DDQ para a formação da porfirina **5**, com rendimento de 12% (para detalhamento experimental e dados espectrais, ver Anexo 4 página 116).



Esquema 9: Reação para a obtenção da 5,15-[bis(fenil)]-10,20-[bis(1-desoxi)-2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-galactitol]porfirina (porfirina **5**).

5.2. DESACETILAÇÃO QUÍMICA

5.2.1. Delineamento de reações de desacetilação química

Foram testadas várias condições de desacetilação química da porfirina **5** para a obtenção do produto completamente desacetilado (porfirina **6**). Estas reações foram monitoradas por CCD, utilizando como fase móvel acetato de etila:metanol:água (13:2:1). Subsequentemente, foi realizada espectrometria de massas MALDI-TOF de algumas bandas presentes na CCD resultante de alíquotas coletadas diretamente do meio reacional.

A Tabela 1 representa as condições testadas para desproteção química da glicoporfirina **5**. Todas as reações foram testadas com 5 mg da glicoporfirina **5**, e aproximadamente 1 mL de meio reacional (para detalhamento experimental, ver Anexo 5, Anexo 6 e Anexo 7, páginas 121, 122 e 123).

Tabela 1: Condições de métodos químicos para a desacetilação da glicoporfirina **5** e produtos obtidos.

	Solvente	Base	Temp	Tempo (horas)	Porfirina
1	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	MeONa (15 eq)	TA	3	6 e penta-acetilada (36)
2	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	MeONa (15 eq)	0°C	3	6 e penta-acetilada (36)
3	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	MeONa (15 eq)	-10°C	3	6 e penta-acetilada (36)
4	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	Dietilamina (1 Eq)	TA	3	nd
5	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	Dietilamina (1 Eq)	0°C	3	nd
6	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	Dietilamina (1 Eq)	-10°C	3	nd
7	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	NH ₃ Saturado	TA	2,5	nd
8	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	NH ₄ OH (24 eq)	TA	2,5	nd
9	MeOH:DMSO (1:1)	MeONa (15 eq)	TA	2	6
10	MeOH:THF (1:1)	MeONa (15 eq)	-10°C	2	6
11	MeOH:THF (1:1)	MeONa (15 eq)	TA	2	6
12	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	MeONa (15 eq)*	-10°C	2	6 e penta-acetilada (36)
13	THF:Et ₂ O:MeOH (1:1:2)	MeONa (15 eq)*	TA	1,5	6
14	THF	MeONa (15 eq)*	TA	1,5	6
15	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	MeONa (15 eq)*	TA	1,5	6 e penta-acetilada (36)
16	MeOH: Et ₂ O	MeONa (15 eq)*	TA	1	6
17	THF: Et ₂ O:MeOH (1:1:2)**	MeONa (15 eq)*	TA	2,5	6
18	MeOH***	MeONa (15 eq)*	TA	2	nd
19	MeOH***	MeONa (15 eq)*	TA	2	nd

* A base foi adicionada de maneira fracionada, a cada 10 minutos durante 1 hora.

** A reação foi realizada em 10 mL de solvente.

*** realizadas após a metalação da glicoporfirina.

As condições das reações, assim como para a metalação da porfirina, estão descritas na seção Anexos (5, 6 e 7).

nd: não foram detectadas as porfirinas **6** ou **penta-acetilada (36)**.

Após testar as diferentes condições de desproteção química, foram escolhidas as condições 3 e 13 (Tabela 1) para teste de *work-up* e preparação em maior escala. Essa escolha baseou-se na presença de bandas principais bem definidas nas análises de CCD destas reações.

A CCD da reação 3 está representada na Figura 13. As bandas principais encontradas nesta CCD foram excisadas para a realização de espectrometria de massas. A banda marcada como **A** (Figura 13) apresentou *m/z* 763,429 [M+H]⁺ (Figura 14) e este valor é equivalente à massa da glicoporfirina totalmente desacetilada (composto **6**). Já a banda **B** apresentou massa correspondente à

porfirina parcialmente acetilada, apresentando um grau de acetilação de 5 grupamentos acetila, com m/z 973,521 $[M+H]^+$ (Figura 15 – porfirina penta-acetilada - **36**). As demais bandas foram identificadas como produtos minoritários, apresentando-se como graus intermediários de acetilação e impurezas.

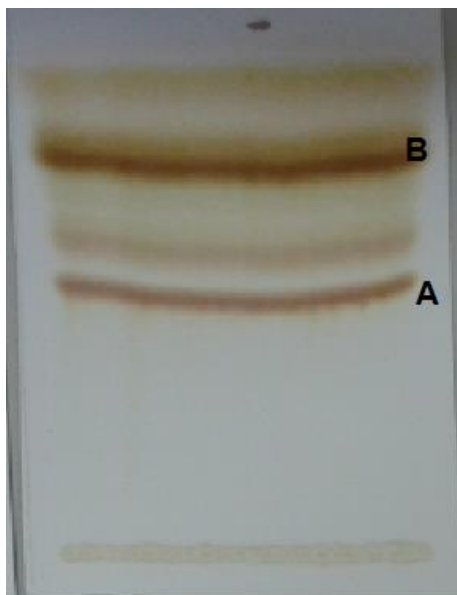


Figura 13: CCD da reação de desacetilação química de número 3 (A) porfirina **6**; (B) porfirina penta-acetilada (**36**).

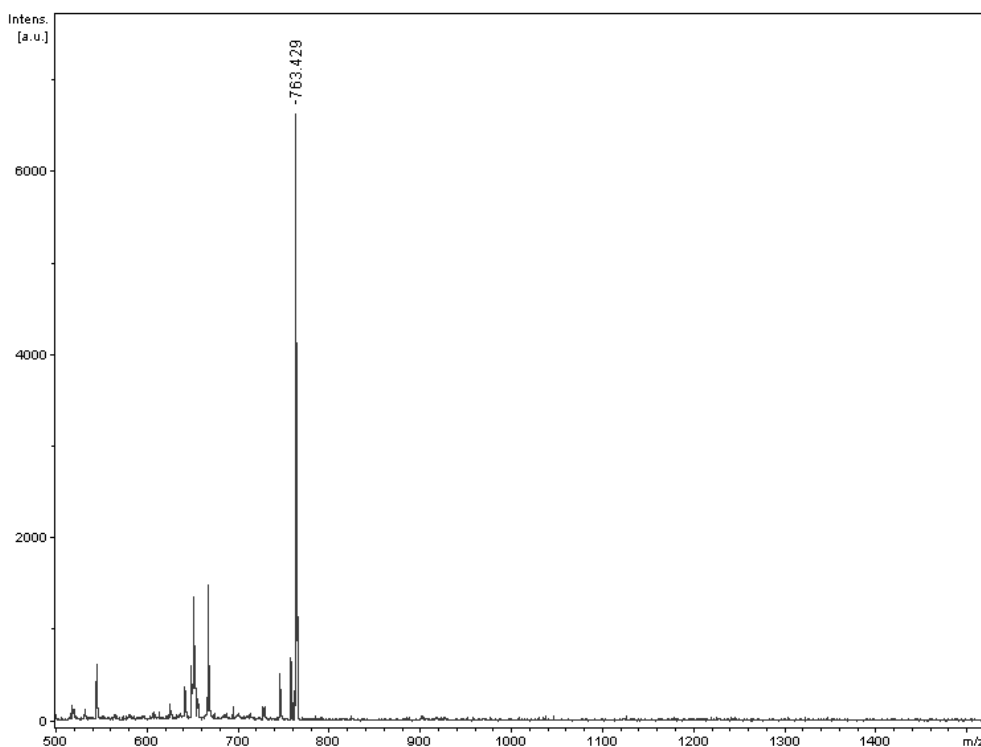


Figura 14: Espectro de massa (MALDI-TOF) da glicoporfirina totalmente desacetilada **6** com íon m/z 763,429 $[M+H]^+$.

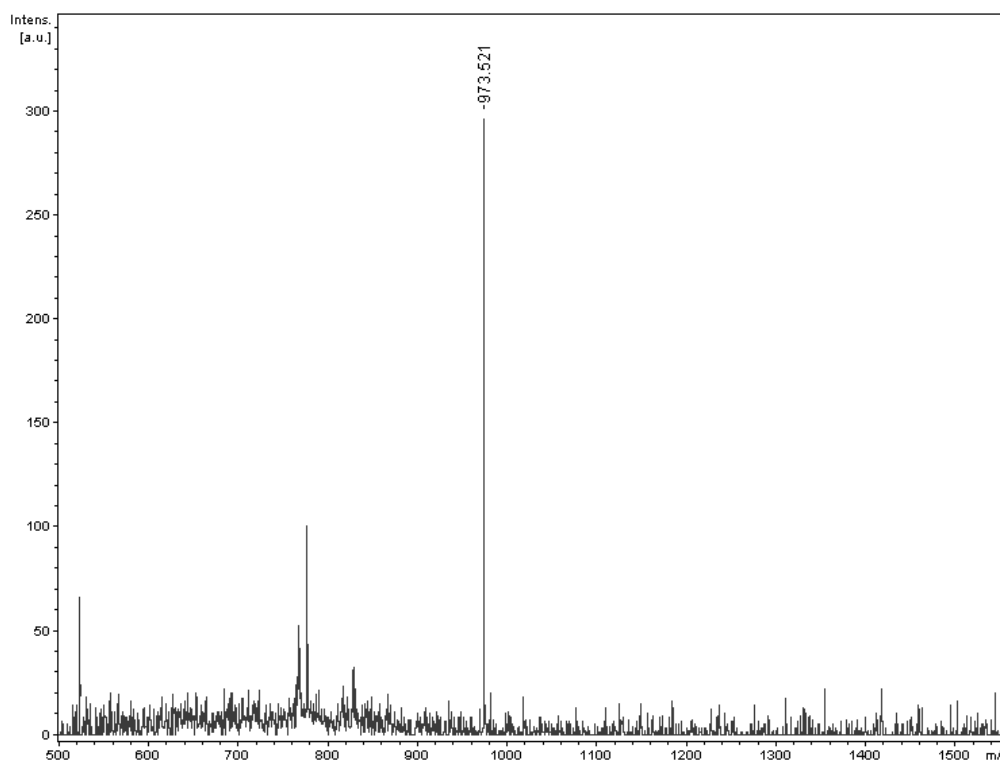


Figura 15: Espectro de massas (MALDI-TOF) da glicoporfirina penta-acetilada **36** com m/z 973,521 $[M+H]^+$.

A Figura 17 apresenta a CCD da reação de número 13 (Tabela 1), que se apresentou de forma semelhante à CCD da reação 3 (Figura 13). Porém, neste caso, apesar de ter ocorrido a formação da porfirina completamente desacetilada **6** não ocorreu a formação de glicoporfirina penta-acetilada **36**. Pôde-se também observar a maior formação de produtos com variados graus de acetilação, quando comparada à reação de número 3.

A não formação do produto penta-acetilado **36** pode, possivelmente, ser justificada por uma alteração na temperatura em que a reação ocorreu, visto que a reação deve ocorrer em temperaturas próximas a -10°C , condição de difícil manutenção em dias muito quentes. Além disso, o produto penta-acetilado **36** pode ter sido degradado no decorrer da reação, e como o tempo para a finalização da reação foi observado com base nas CCDs de monitoramento da reação, ocorreu a formação de outro produto com R_f próximo ao R_f do produto penta-acetilado **36**, podendo ser um produto de degradação deste.

Ao repetir a reação de número 3, não foi possível observar a formação do composto penta-acetilado **36**. Pôde ser observada a diferença entre o R_f das bandas assinaladas, na comparação com duas reações realizadas (demonstradas nos pontos vermelhos) e do padrão penta-acetilado **36** (representado pelo ponto de coloração preta – Figura 16).

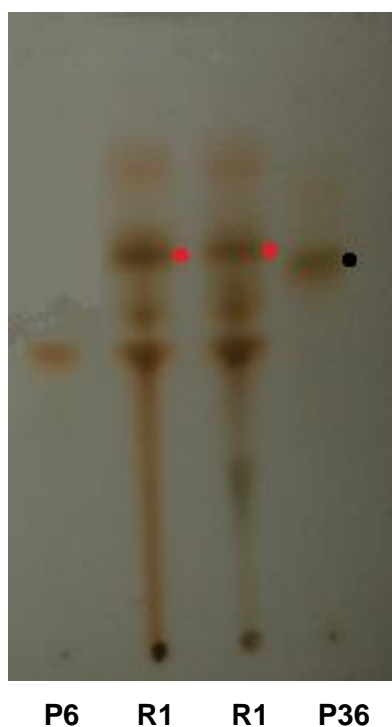


Figura 16: CCD da reprodução da reação 3 **R1** e padrão (**P6** – padrão porfirina **6**; **P36** – padrão porfirina penta-acetilada **36**).

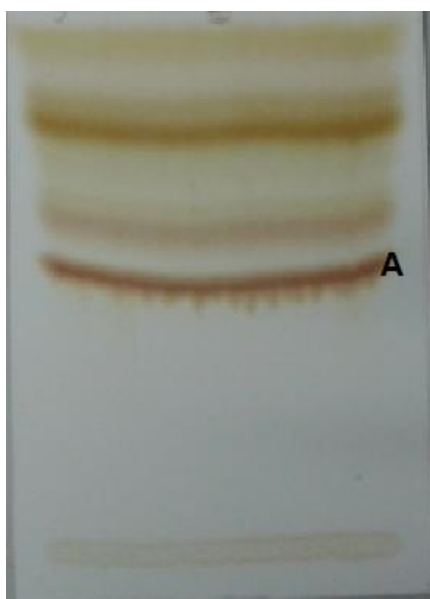


Figura 17: CCD da reação de desacetilação química de número 13.

A Figura 18 apresenta os espectros de RMN de ^1H a 30°C das porfirinas **5**, penta-acetilada **36** e **6** respectivamente. Apesar do espectro do material contendo cinco grupamentos O-acetila (Figura 18 B) estar um pouco comprometido devido à diluição da amostra, foi possível observar que esta fração era constituída de uma molécula penta-acetilada **36** em particular, e não uma mistura de produtos penta-acetilados. Ao avaliar comparativamente estes espectros, pode-se observar que o espectro da Figura 18 B apresenta sinais intensos, correspondentes aos hidrogênios β -pirrólicos equivalentes aos sinais da porfirina totalmente acetilada **5** (região **a**), assim como apresenta sinais correspondentes hidrogênios β -pirrólicos (**c**) equivalentes aos mesmos sinais da porfirina desacetilada **6**. Observou-se também uma região de menor intensidade correspondente aos sinais dos hidrogênios pertencentes aos açúcares da porfirina completamente acetilada **5** (Figura 18 A – **b**) e sinais referentes aos hidrogênios dos açúcares da porfirina desacetilada **6** (**d**) no espectro referente à porfirina penta-acetilada **36**. Esta avaliação indicou que, surpreendentemente, a porfirina penta-acetilada **36** apresenta uma de suas porções açúcar completamente desacetilada e a outra completamente acetilada.

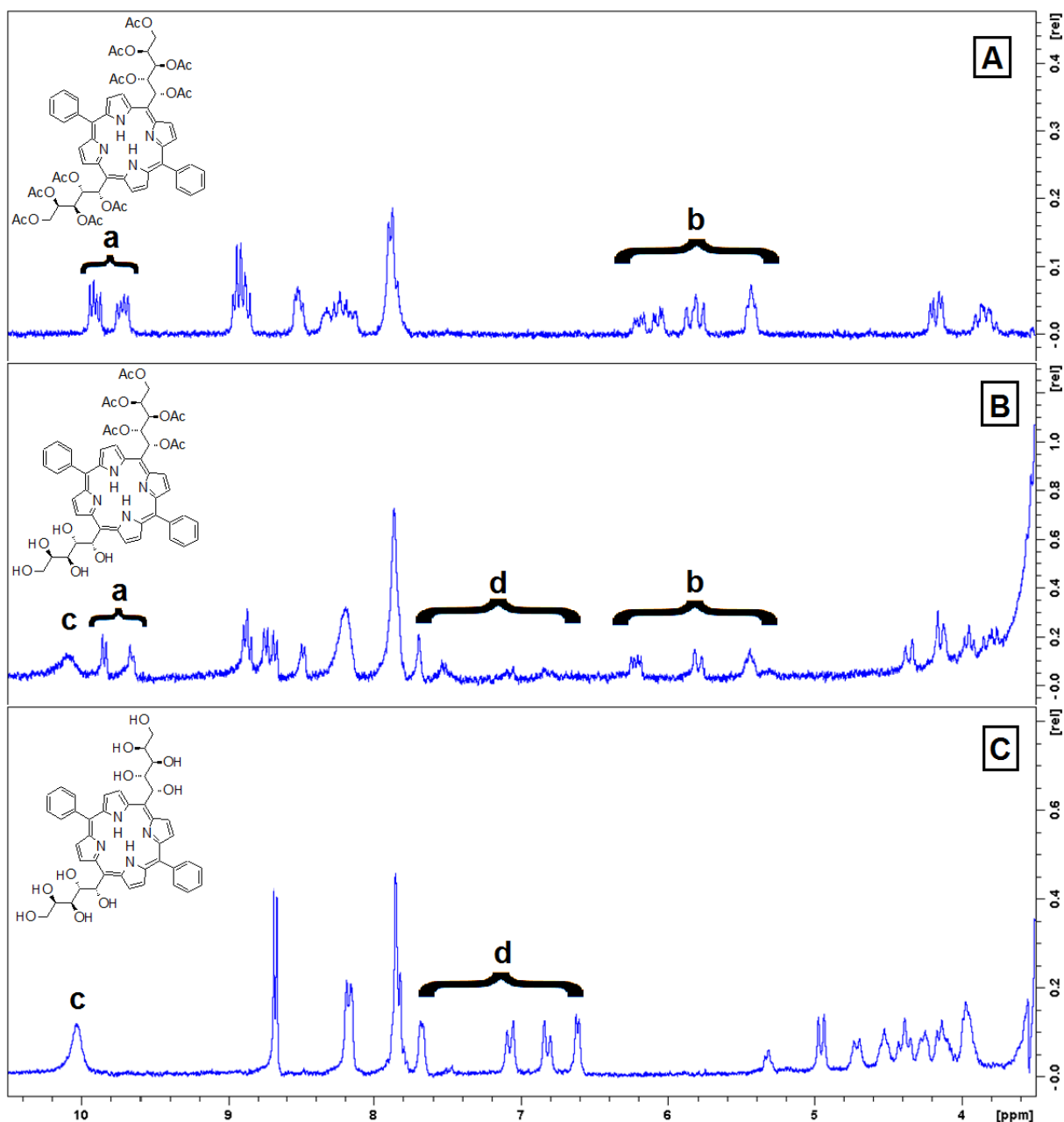


Figura 18: Espectros de RMN de ^1H a 30°C (200,1 MHz – DMSO-d_6) das porfirinas **5** (A), penta-acetilada **36** (B) e **6** (C).

A obtenção da porfirina penta-acetilada **36** pode ter ocorrido pela formação de micelas no meio reacional, com o envolvimento do material inicial (composto **5**). Isto poderia explicar a desacetilação parcial unilateral da molécula. Desta maneira, foram desenhadas algumas condições reacionais, com a utilização de tensoativos para tentar minimizar a possível formação de micelas do material inicial, promovendo um aumento no rendimento do produto desacetilado **6**.

Foi observada uma grande dificuldade quanto a obtenção da porfirina contendo 5 grupamentos *O*-acetila, pois aparentemente a formação desta porfirina

depende de uma manutenção precisa da temperatura do meio reacional, além de ser requerido que a solução de base seja recém preparada, outro parâmetro de extrema importância para a obtenção desta porfirina é o tempo de reação, pois esta porfirina se torna desacetilada tão logo quanto se forma. Por estes motivos, a procura por condições específicas para a obtenção esta porfirina foi abandonada, visto que sua formação não ocorria de forma reprodutível e considerando que a obtenção deste produto específico não era um dos objetivos deste trabalho.

5.2.2. Desacetilação química partindo do material inicial peracetilados em diferentes formas sólidas

Com intuito de alcançar os maiores rendimentos possíveis para obtenção da porfirina **6**, foram realizadas reações de desacetilação química partindo-se da porfirina **5** purificada de três diferentes maneiras: por cristalização (em ciclohexano), precipitação (adição de hexano sobre a porfirina solubilizada em CH_2Cl_2) ou coluna cromatográfica (eluição com acetato de etila/hexano; 1:2, gradiente para 1:1). Estes experimentos foram delineados, visto que as diferentes formas sólidas dos materiais iniciais podem originar diferentes taxas de solubilização ou agregação e, conseqüentemente, influenciar nos rendimentos de produto final. Estas reações foram realizadas nos dois sistemas solventes previamente descritos na Tabela 1 (entradas 3 e 13), os quais mostraram-se eficientes para a desacetilação por via química da porfirina **5**.

As reações realizadas nesta etapa do trabalho estão descritas na Tabela 2, foram realizadas em *viais*, sob agitação magnética e a 0°C, o monitoramento foi realizado através de CCD. Os resultados podem ser observados na Figura 19, onde é possível observar a imagem de uma CCD aos 60 minutos de reação, evidenciando que o uso do material proveniente da coluna cromatográfica, reações (20 e 13) indicadas por setas, proporciona uma maior quantidade do produto desejado (estimado pela intensidade das manchas na CCD).

Tabela 2: Condições de reações de desacetilação química, partindo de material inicial **5**, obtido por diferentes métodos de purificação.

	Porfirina	Base	Solvente	Origem do material de partida (5)
20	5	MeONa (15 eq)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (1:1)	Cromatografado
21	5	MeONa (15 eq)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (1:1)	Cristalizado
22	5	MeONa (15 eq)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (1:1)	Precipitado
23	5	MeONa (15 eq)	MeOH:THF:Et ₂ O (2:1:1)	Cromatografado
24	5	MeONa (15 eq)	MeOH:THF:Et ₂ O (2:1:1)	Cristalizado
25	5	MeONa (15 eq)	MeOH:THF:Et ₂ O (2:1:1)	Precipitado
P	Padrão desacetilado 6			

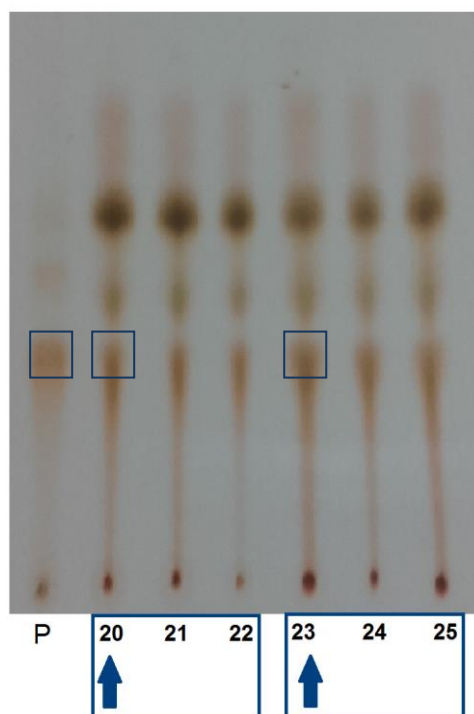


Figura 19: CCD das reações de desacetilação partindo de material inicial **5** obtido por diferentes formas de purificação.

5.2.3. Desacetilação química auxiliada pelo uso de tensoativos

As reações de desacetilação química auxiliada pelo uso de tensoativos foram realizadas com intuito de aumentar o rendimento do produto totalmente desacetilado **6** através da prevenção de formação de possíveis micelas envolvendo o porfirina **5**.

Primeiramente foi testado o uso do tensoativo aniônico lauril sulfato de sódio (LSS), para verificar a melhor quantidade e forma de utilização do tensoativo para as reações subsequentes (condições 26–29 –Tabela 3). Estas reações foram realizadas no sistema solvente MeOH:THF:Et₂O (2:1:1), utilizando MeONa 0,5 mol/L em MeOH como base (15 eq), sob agitação magnética e a 0°C, e foram monitoradas por CCD (Figura 20). A condição escolhida para teste com outros surfactantes foi a condição de número 28 (indicada pela seta).

Foram então escolhidos um surfactante catiônico (CETAVLON – brometo de cetiltrimetilamônio) e um surfactante não iônico (TRITON x100), para reação nas mesmas condições 33 e 34. Estes surfactantes (catiônico, aniônico e não iônico) foram também testados frente a uma mistura de solventes diferente, MeOH:CH₂Cl₂ (1:1), condições 30-32 Tabela 3.

Tabela 3: Reações de desacetilação química auxiliadas pelo uso de tensoativo.

	Solvente	Tensoativo
13	MeOH:THF:Et ₂ O (2:1:1)	Ausência de tensoativo
26	MeOH:THF:Et ₂ O (2:1:1)	0,5 mg de LSS
27	MeOH:THF:Et ₂ O (2:1:1)	250 µL de sol. LSS + 250 µL de água
28	MeOH:THF:Et ₂ O (2:1:1)	250 µL de sol. LSS
29	MeOH:THF:Et ₂ O (2:1:1)	500 µL de sol. LSS
30	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	250 µL de sol. LSS
31	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	250 µL de sol. CETAVLON
32	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	250 µL de sol. TRITON x100
33	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	250 µL de sol. CETAVLON
34	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	250 µL de sol. TRITON x100

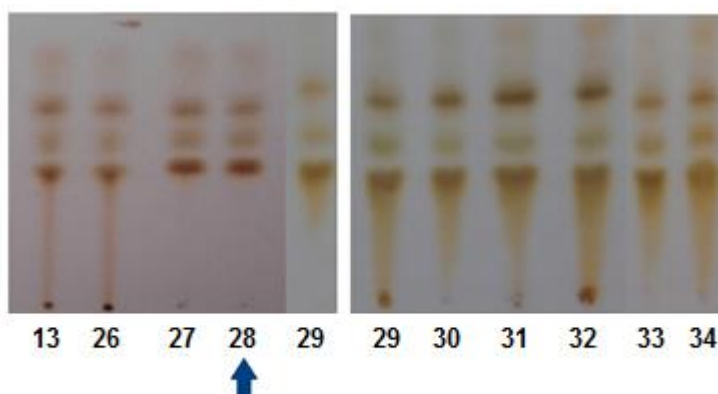


Figura 20: CCD das reações de desacetilação auxiliadas pelo uso de tensoativo.

Após estes experimentos, a reação com a utilização de tensoativo que apresentou um melhor perfil de CCD (apresentando um sinal de maior intensidade correspondente ao produto desacetilado), foi a reação de número 28, utilizando o tensoativo LSS e a mistura de solventes MeOH:THF:Et₂O (2:1:1), desta maneira, esta reação foi repetida em maior escala para verificar o rendimento.

5.2.4. Otimização do rendimento da porfirina desacetilada 6

Visando obter os melhores rendimentos possíveis da porfirina totalmente desacetilada (**6**), via desacetilação química, foram realizadas três das reações preparativas de desacetilação, baseadas nas reações analíticas previamente testadas, para a comparação de rendimento. Para tal, foram escolhidas as reações descritas no Anexo 5 página 121 (reação 3), Anexo 6 página 122 (reação 13) e a reação número 28 da Tabela 3. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.

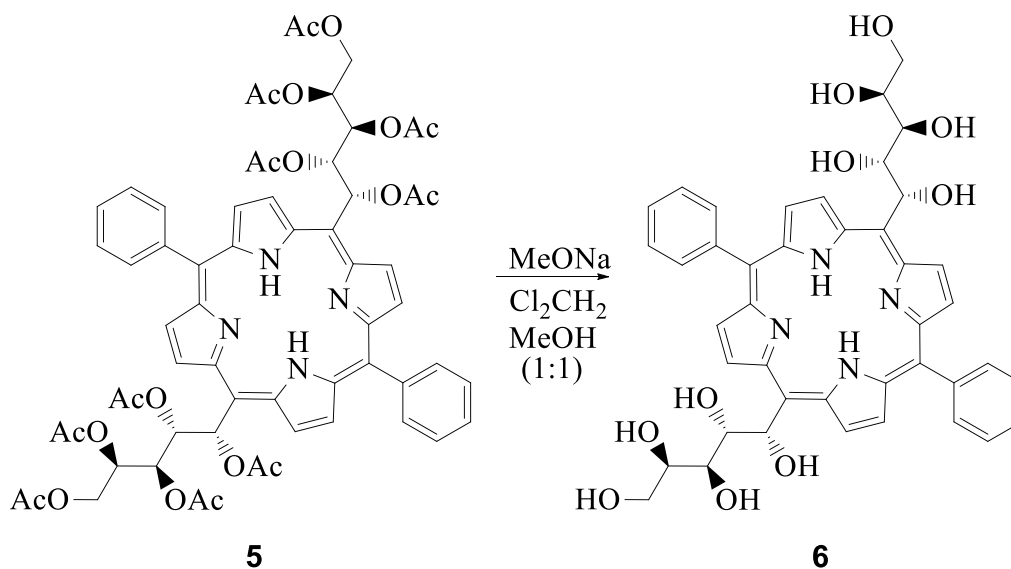
Tabela 4: Resultados da otimização de rendimento da porfirina **6**, utilizando metóxido de sódio como base.

Condição	Solvente	Tensoativo	Rendimento
3	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	-	28%
13	MeOH:THF:Et ₂ O (2:1:1)	-	8%
28	MeOH:THF:Et ₂ O (2:1:1)	LSS	20%

Ainda com o objetivo de aumentar o rendimento da obtenção da porfirina **6**, foram realizadas reações com a utilização de ultrassom, estas foram realizadas em tubos de hidrólise, iniciadas a -10°C e monitoradas por CCD. Primeiramente, foi realizada uma reação utilizando o sistema solvente escolhido para as reações de desacetilação química (diclorometano/metanol - 1:1) (condição 35), sendo que o monitoramento por CCD indicou formação de um menor número de produtos intermediários de desacetilação, porém, com a formação de um único produto intermediário em maior quantidade. Subsequentemente, foram reavaliadas algumas condições realizadas

anteriormente, no intuito de se encontrar uma condição que proporcionasse uma menor formação deste produto intermediário em questão. A condição que mais se adequou à situação (THF:metanol - 1:1) (condição 36) foi então adaptada à utilização de ultrassom, visando obter maior quantidade de material desacetilado e menor número de produtos intermediários. Entretanto, o perfil de CCD resultante destas condições não apontava qualquer melhora quando comparada às condições anteriormente testadas.

Apesar dos esforços empregados para o aumento do rendimento da porfirimina **6**, a condição que ainda apresentava melhores resultados por análise da CCD, correspondia a condição detalhada no Anexo 5 (Tabela 4), a qual forneceu um rendimento de 28%. Uma vez que, baseando-se na CCD correspondente a esta condição, o rendimento obtido era muito baixo, esta reação foi repetida, entretanto utilizando uma purificação cromatográfica envolvendo a incorporação da amostra em pequena quantidade de sílica e utilização de sílica ativada (Anexo 8 – página 124). Com a modificação introduzida, foi possível obter um rendimento de 67% para esta reação (Esquema 10). Devido às dificuldades encontradas para promover a desacetilação química, este rendimento foi considerado satisfatório.



Esquema 10: Reação para a obtenção da porfirimina **6**.

5.3. DESACETILAÇÃO ENZIMÁTICA

5.3.1. Desacetilação enzimática por transesterificação

Com intuito de obter diferentes glicoporfirinas parcialmente acetiladas, foram primeiramente realizadas reações com uma lipase comercial imobilizada (Novozym 435), lipase de *Candida antarctica* B (CAL-B) para a promoção de desacetilação regiosseletiva da porfirina totalmente acetilada **5**. Desta maneira, foram pesquisadas em bases de dados como o Reaxys®, condições ideais para a realização da reação. Foi então proposta uma condição reacional, baseada nas condições delineadas por Prasad e colaboradores (2006), Singh e colaboradores (2011) e Sharma e colaboradores (2014). Estas condições baseiam-se na adição de *n*-butanol ao meio reacional, o qual tem o papel de receber os grupos O-acetila presentes no material inicial a ser desacetilado. Desta forma, este tipo de reação é caracterizado como transesterificação.

Foi então testada uma condição (37) utilizando 5 mg de porfirina peracetilada **5**, 0,5 mL de THF como solvente, 20 µL de *n*-butanol como acceptor de grupamentos acila e 2,5 mg da lipase Novozym 435 (50% m/m) reagindo em sistema fechado a 50°C. A reação foi mantida sob estas condições durante 5 dias, sob agitação magnética, e monitorada por CCD. Não houve a formação de qualquer produto. Foi então aumentada a quantidade de enzima para 10 mg (200% m/m) (condição 38), mantidas as mesmas condições, o que também não gerou produtos de reação.

Desta maneira, percebeu-se a necessidade de avaliar a atividade de hidrólise enzimática em meio aquoso e orgânico.

5.3.2. Atividade enzimática em meio aquoso

A atividade enzimática em meio aquoso foi analisada em diferentes condições frente ao trioleato de triglicerila, o qual é o substrato padrão deste tipo de enzima. A enzima Novozym 435 apresentou baixa atividade quando utilizada em uma quantidade de 80 mg de enzima a 25°C, como demonstrado na Tabela 5. Nas demais condições não foi detectada qualquer atividade. O Gráfico 1 representa em detalhes a atividade da enzima nas condições da entrada 4 da Tabela 5.

Tabela 5: Resultados para atividade de hidrólise enzimática em meio aquoso

Entrada	Massa enzima (mg)	Temperatura (°C)	Atividade (μmol/min)
1	1	50	0
2	2	50	0
3	1	25	0
4	80	25	0,45

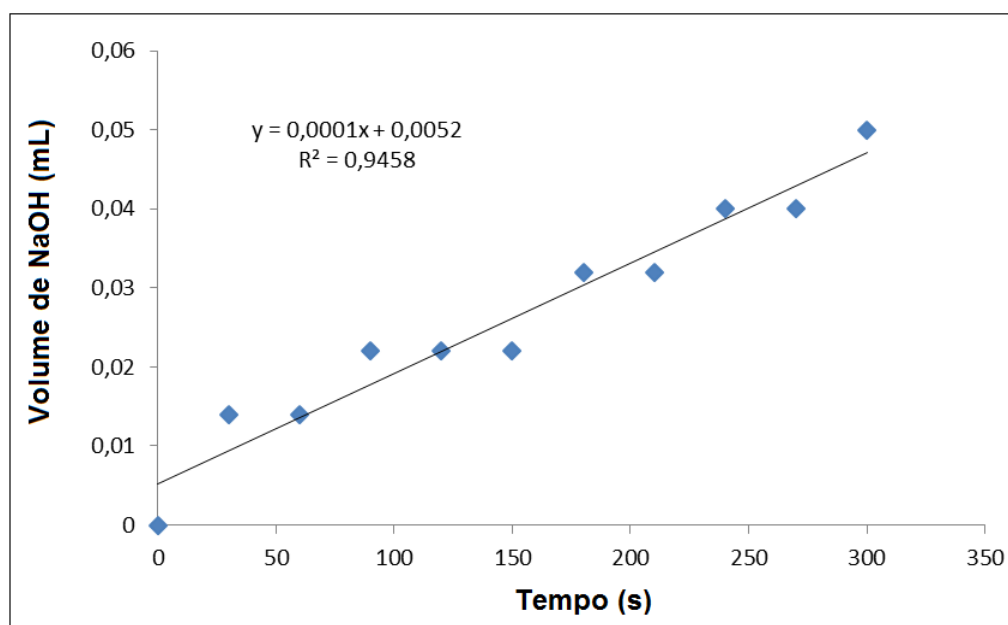


Gráfico 1: Curva de atividade de hidrólise enzimática em meio aquoso.

5.3.3. Atividade enzimática em meio orgânico

A atividade de hidrólise enzimática em meio orgânico (hexano, contendo 2% de água) foi testada com 30 mg de enzima, e esta apresentou atividade de 114,93 U/g. A curva de calibração e a curva de atividade enzimática estão representadas nos Gráfico 2 e Gráfico 3 respectivamente.

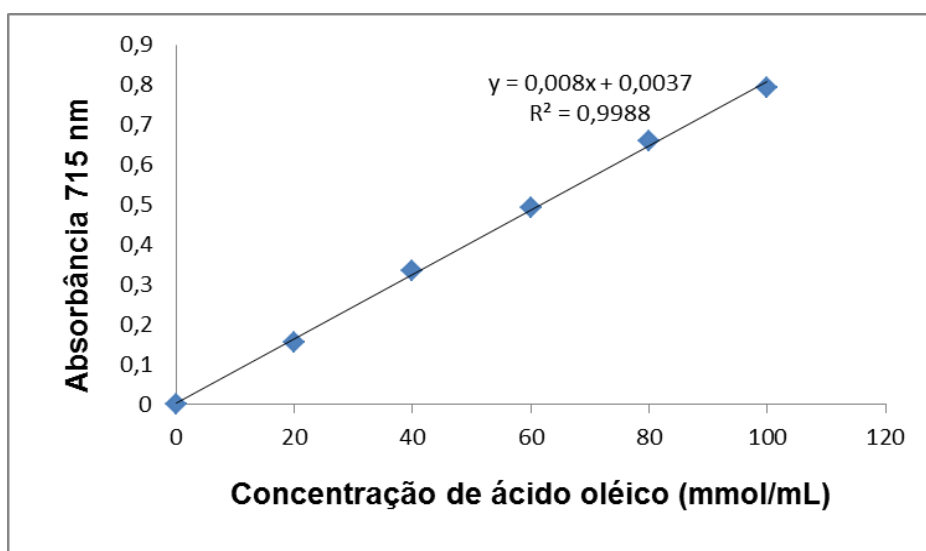


Gráfico 2: Curva de calibração do reagente de cor para determinação de atividade de hidrólise enzimática em meio orgânico.

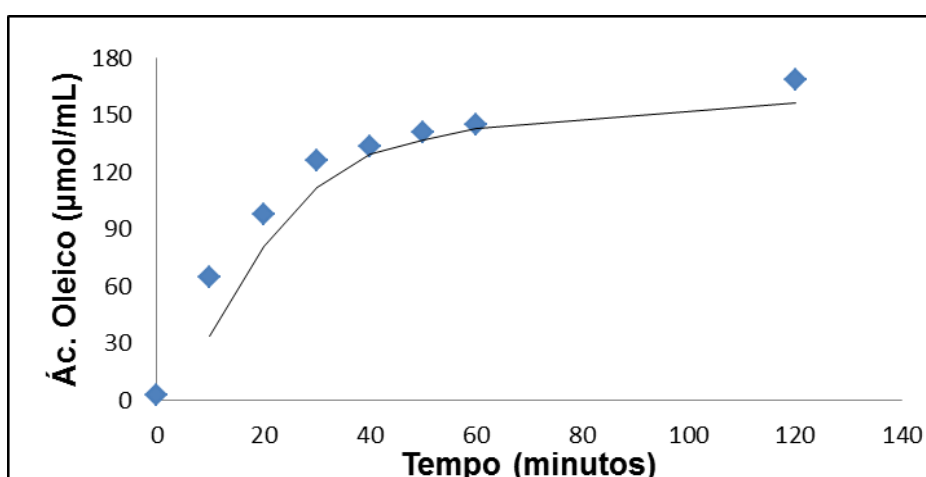


Gráfico 3: Curva de determinação da atividade de hidrólise enzimática em meio orgânico.

Esses resultados indicaram que a enzima Novozym 435 apresenta uma boa atividade de hidrólise frente à triacilgliceróis em meio orgânico (hexano) contendo pequenas quantidades de água. A partir destes resultados, foram avaliadas reações de hidrólise enzimática, a partir da glicoporfirina peracetila, em meios equivalentes ao utilizado para a verificação da atividade enzimática.

5.3.4. Desacetilação enzimática na presença de água

Após a verificação da existência de atividade de hidrólise da enzima testada, foram exploradas outras condições de reação para as tentativas de promover a hidrólise enzimática da porfirina totalmente acetilada **5**. Dentro deste estudo também foram inseridas outras enzimas, disponibilizadas pelo laboratório NPDEAS (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto Sustentável) da UFPR, frente às mesmas condições. Além disso, foi testada uma condição utilizando hexano como solvente, com ou sem adição de água, visto que a utilização do deste solvente é conhecidamente eficiente para ativação enzimática, quando realizado o teste de atividade enzimática em meio orgânico. Além disso, a utilização de hexano, e outros solventes apolares, é referenciada por aumentar a seletividade de lipases (RAMINELLI et al., 2004; FERRER et al., 2005).

A porfirina **5** também foi submetida à uma reação utilizando DIPE (éter diisopropílico) como solvente para as condições envolvendo a lipase TLIM, de acordo com Sharma e colaboradores (2009) e Hietanen e Kanerva (2012). Além disso, foi avaliada a adição de tampão fosfato ao meio reacional, para a manutenção de pH adequado para o funcionamento da enzima, como descrito por Garcia e colaboradores (2002) e Bencze e colaboradores (2011).

Desta maneira, foram delineadas as condições, sendo estas reações monitoradas por CCD semi-preparativa e posterior realização de espectrometria de massas (MALDI-TOF). As condições e resultados destas reações podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6: Avaliação qualitativa da ocorrência de desacetilação por hidrólise enzimática a partir da porfirina **5**, através da utilização de diferentes lipases imobilizadas comerciais.

	Condição ^a	Enzima	Tempo	Desacetilação ^b
39	1	Lipase - CAL-B	48 h	-
40	1	Controle	48 h	-
41	2	Lipase - CAL-B	48 h	-
42	2	Controle	48 h	-
43	3	Lipase - CAL-B	48 h	-
44	3	Controle	48 h	-
45	4	Lipase - CAL-B	48 h	-
46	4	Controle	48 h	-
47	5	Controle	48 h	-
48	5	Lipase - CAL-B	48 h	-
49	5	Lipase - Lipozyme RMIM	48 h	-
50	5	Lipase - Lipozyme TLIM	48 h	-
51	5	Lipase - Lipolase 100T	48 h	-
52	5	Amilase - Termamyl 120T	48 h	-
53	5	Lipase - CCL	48 h	-
54	5	Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	48 h	-
55	6	Controle	48 h	-
56	6	Lipase - CAL-B	48 h	-
57	6	Lipase - Lipozyme RMIM	48 h	-
58	6	Lipase - Lipozyme TLIM	48 h	-
59	6	Lipase - Lipolase 100T	48 h	-
60	6	Amilase - Termamyl 120T	48 h	-
61	6	Lipase - CCL	48 h	-
62	6	Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	48 h	-
63	7	Lipase - Lipozyme TLIM	48 h	-
64	8	Lipase - CAL-B	48 h	-
65	9	Lipase - CAL-B	48 h	+
66	9	Lipase - Lipozyme RMIM	60 h	+
67	9	Lipase - Lipozyme TLIM	60 h	+
68	9	Lipase - Lipolase 100T	60 h	+
69	9	Amilase - Termamyl 120T	60 h	+
70	9	Lipase - CCL	60 h	+

^a condições: 1) hexano, água 2%; 2) hexano, água 20%; 3) hexano, água 2%, surfactante TRITON x 100; 4) hexano, água 20%, surfactante TRITON x 100; 5) THF, n-butanol, água; 6) THF, hexano, água; 7) DIPE, n-butanol; 8) THF, tampão fosfato; 9) THF, MeOH, tampão fosfato. Operadas em *shaker* 50 rpm a 45°C.

^b desacetilação evidenciada pela observação, por MALDI-TOF, da formação dos íons m/z 1142, 1100 e/ou 1058 $[M+H]^+$, os quais correspondem, respectivamente, a hidrólise de um, dois e três grupos acetila a partir da porfirina **5**.

As avaliações por MALDI-TOF indicaram quais enzimas e condições reacionais ocasionaram a desacetilação. Para reações que apresentaram resultado positivo, foi possível observar principalmente um íon com m/z 1100, o que corresponderia a uma porfirimina (ou uma mistura de porfirinas) contendo 8 grupamentos *O*-acetila. Invariavelmente, o íon de m/z 1100 era acompanhado pelos íons m/z 1142 (nove grupos *O*-acetila) e m/z 1058 (sete grupos *O*-acetila) (Figura 21). Também foi possível observar que a utilização de tampão fosfato (Tabela 6 condição 9 – reações 69 a 70) proporcionou resultado positivo para todas as enzimas avaliadas, indicando que a presença do meio aquoso e manutenção do pH = 7 é essencial para proporcionar a remoção dos grupos acetila do substrato representado pela porfirimina **5**.

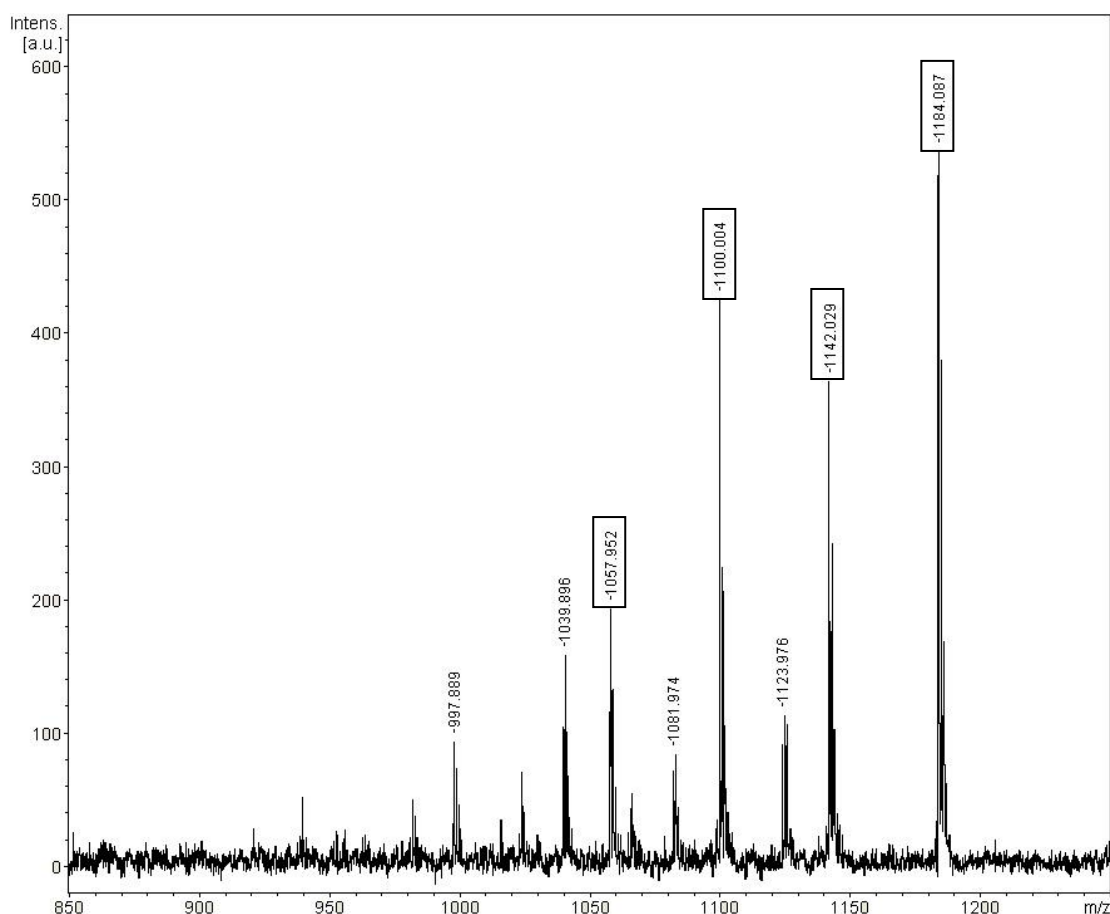


Figura 21: Espectro de massas (MALDI-TOF) da reação de desacetilação de número 27 (Tabela 6). Os íons de m/z 1184 1142, 1100 e 1058 $[M+H]^+$, correspondem à glicoporfirinas contendo dez, nove, oito e sete grupos *O*-acetila, respectivamente.

Com base nos resultados obtidos, a reação de número **65** (Tabela 6) foi escolhida para a realização de um experimento em maior escala. Desta forma

seria possível proceder a purificação, caracterização do produto formado e verificação da posição dos grupamentos O-acetila retirados pela lipase, além de verificar o rendimento da reação. Esta condição foi escolhida por apresentar um bom rendimento qualitativo (baseado no perfil de CCD) da porfirina contendo 8 grupamentos O-acetila, e utilizar a enzima Novozym 435, a qual aparentemente fornecia um perfil de hidrólise aceitável em um menor tempo de reação (48 h) quando comparado as outras enzimas avaliadas (60 h).

5.3.5. Reutilização da enzima

Após a determinação da melhor condição de reação (reação de número **65** – Tabela 6), esta foi repetida com a utilização de enzima previamente utilizada em reação enzimática, com intuito de avaliar a possibilidade de reutilização da enzima (71). Segundo Sebrão e colaboradores (2011), é possível recuperar e reutilizar as lipases em diversas reações. Foi verificada, de forma qualitativa, pela análise das CCDs da reação e análise de MALDI-TOF, a formação dos produtos desejados, porém, em menor quantidade do que as reações realizadas com enzima nova, portanto, apesar de ser possível obter o produto desejado com a utilização da enzima reutilizada, o trabalho foi continuado com a utilização de enzima nova.

5.3.6. Escalonamento da reação de desacetilação enzimática

A reação de desacetilação enzimática **65** com a utilização de THF:MeOH:Tampão fosfato (1:1:1) como sistema solvente e lipase imobilizada de *C. antarctica B* (CAL-B, Novozym 435 – Novozymes®), na proporção 1:1 (m/m) enzima:substrato, foi escolhida para a experimentação em maior escala, visando purificar e caracterizar seus produtos principais.

Desta maneira, a reação foi realizada em balão de 50 mL, e aumentada em 10 vezes, em relação à versão analítica (reação 65, Tabela 6). A reação

não ocorreu de maneira favorável neste escalonamento, não havendo a formação dos produtos desejados, provavelmente pelo contato reduzido entre a enzima e o substrato.

A reação foi realizada em escala duplicada em relação à sua versão analítica e utilizando-se *vial* como frasco de reação (para detalhamento da reação, ver Anexo 9 - página 129). Ao verificar a viabilidade da reação nesta escala, esta foi então realizada em várias replicatas em paralelo, a fim de se obter material suficiente para a caracterização e realização dos ensaios fotofísicos dos produtos obtidos.

Por apresentar produtos com estruturas químicas de alta semelhança, e consequentemente Rfs próximos, optou-se fazer a purificação destes produtos com a utilização de CCD preparativa.

5.3.6.1. Purificação dos produtos de desacetilação enzimática

Para a realização de CCD preparativa para a purificação dos produtos da reação de desacetilação enzimática, o material proveniente da reação foi aplicado na CCD com auxílio de pipeta pasteur, como demonstrado na Figura 22-A, por gotejamento formando linhas por pontos justapostos. A placa foi então eluída com a fase móvel (FM) de escolha em cubas cromatográficas, como apresentado na Figura 22-B.

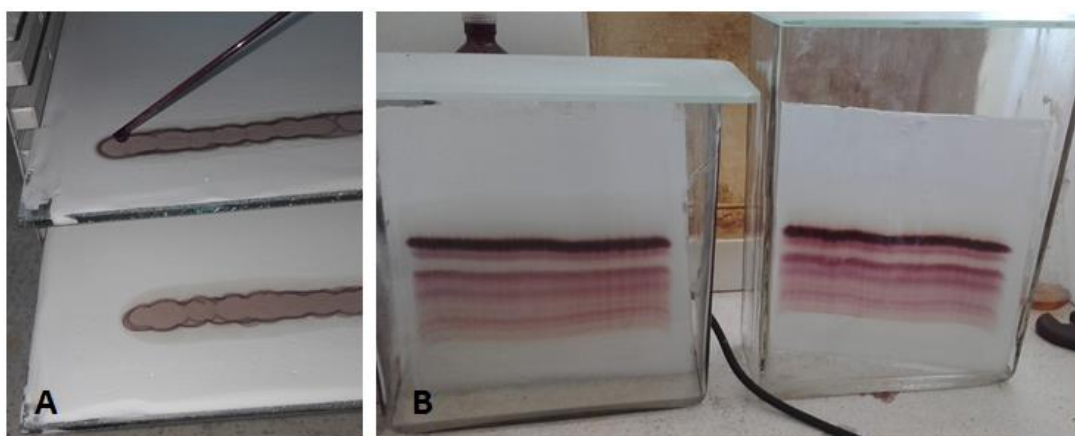


Figura 22: A – Aplicação de amostra em placa de CCD preparativa com auxílio de pipeta pasteur; B – Cubas de eluição de placas de CCD preparativa.

Para a separação dos produtos provenientes da reação em questão foi escolhida como FM a mistura de acetato de etila:hexano (1:1), uma vez que a mesma proporcionava uma boa separação dos compostos presentes na mistura reacional (Figura 23 A). Após excisão das bandas correspondentes aos produtos desejados, estas frações foram extraídas com THF (solvente que promoveu a melhor solubilização das moléculas), filtradas com auxílio de funil contendo placa sinterizada, secas sob pressão reduzida e liofilizadas.

Porém, quando estas frações foram pesadas, foi verificado que a suas massas não correspondiam à uma massa real, pois totalizavam um rendimento maior que 100%. Desta maneira, foi constatado que a remoção da sílica com a utilização de funil sinterizado permitia a passagem de partículas de sílica, impossibilitando assim a verificação do rendimento da reação. Para a verificação do rendimento da reação, foi então necessário realizar uma coluna cromatográfica, visando aumentar a pureza do produto, assim como eliminar o restante de sílica proveniente da CCD preparativa.

Ao realizar-se uma CCD analítica para confirmação do isolamento do produto desejado, antes de proceder a purificação por coluna cromatográfica, foi verificado que os produtos parcialmente acetilados não existiam mais, havendo apenas a presença do material inicial **5**. O fato foi confirmado pela realização de MALDI-TOF das amostras.

Foi então constatado que a porfirina parcialmente acetilada possivelmente possua funções autocatalíticas, promovendo a reacetilação de suas hidroxilas livres na presença do solvente acetato de etila, em coluna de sílica, uma vez que a fase móvel utilizada até então era constituída por acetato de etila:hexano (1:1). Desta maneira, foram testadas outras fases móveis (Figura 23) com intuito de promover a separação das moléculas parcialmente acetiladas, sem que os produtos obtidos fossem reacetilados. Estes testes foram realizados com auxílio de CCD analítica e, posteriormente, a mistura de solvente era empregada para a utilização em CCD preparativa.

Após os testes para o desenvolvimento de novas fases móveis (FM), aquelas constituídas por clorofórmio:metanol (97:3) e THF:ciclohexano (1:1) foram selecionadas e avaliadas mais detalhadamente. Como pode ser observado na Figura 23 B, a utilização da FM clorofórmio:metanol (97:3) não foi eficiente na separação dos produtos de reação. O fato foi comprovado, por

CCD analítica e MALDI-TOF das frações isoladas e após a realização de coluna cromatográfica utilizando a fase móvel em questão. A outra FM escolhida (THF:ciclohexano, 1:1 – Figura 23 C), apesar de mais eficiente que a FM constituída por clorofórmio:metanol (97:3), também não proporcionou uma separação efetiva, mesmo quando combinava-se CCD preparativa seguida da realização de colunas cromatográficas.

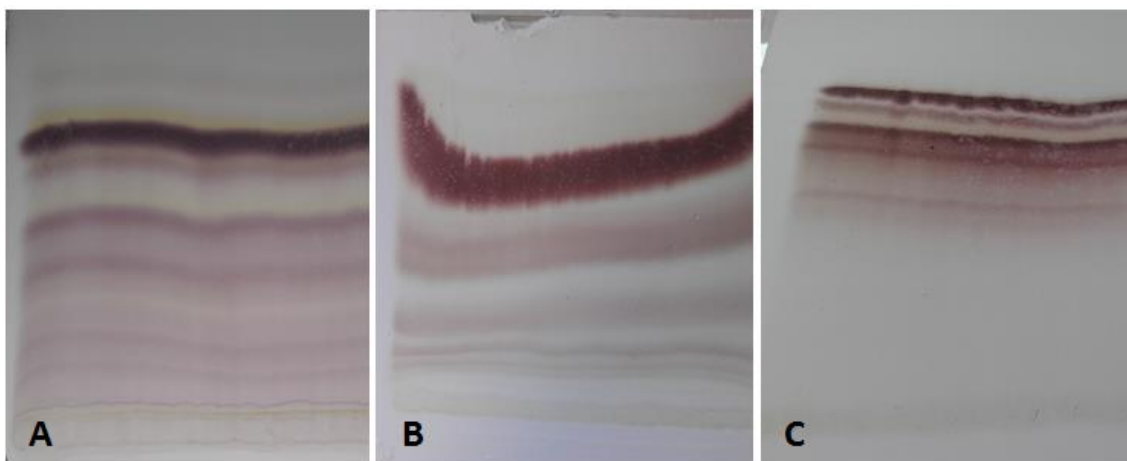


Figura 23: Fases móveis CCD preparativa para reações de desacetilação enzimática: A – acetato de etila: hexano (1:1); B – clorofórmio: metanol (3%); C – THF:ciclohexano (1:1)

Além disso, foi testada a purificação utilizando colunas cromatográficas subsequentes, com diferentes fases móveis e estacionárias. Primeiramente foi utilizada uma coluna de sílica e fase móvel clorofórmio:metanol (97:3), seguida de coluna de sílica e fase móvel THF:ciclohexano (1:1) e, posteriormente, coluna de alumina com fase móvel diclorometano. Mesmo com este processo não foi possível obter de forma isolada qualquer dos produtos desta reação.

Sendo assim, no intuito de obter-se uma fração porfirínica parcialmente acetilada com o máximo de pureza possível, foi realizado o seguinte processo de purificação cromatográfica: (a) coluna de alumina, utilizando primeiramente diclorometano como fase móvel para promover a eluição da porfina inicial peracetilada **5** (contendo dez grupamentos O-acetila); (b) aumento gradual da polaridade com acetato de etila, até se obter uma fase móvel diclorometano:acetato de etila (1:1). Esse processo possibilitou a obtenção de uma mistura de porfirinas parcialmente acetiladas, com predominância de uma porfina (ou mistura de porfirinas) contendo nove grupos O-acetila. É

importante destacar que mesmo utilizando uma FM contendo acetato de etila, aparentemente, a substituição da sílica pela alumina prevenia a reacetilação das porfirinas parcialmente acetiladas.

Através da espectrometria de massas (MALDI-TOF) da mistura reacional da reação em questão (Figura 24 A), foi possível observar a presença bastante expressiva de porfirinas contendo dez, nove, oito e sete grupamentos O-acetila, cujos íons $[M+H]^+$ apresentaram as m/z esperadas de 1184, 1142, 1100 e 1058, respectivamente. Após a purificação, pode ser observada uma grande quantidade de material porfirínico contendo nove grupamentos O-acetila, com m/z 1142 $[M+H]^+$, e uma pequena quantidade de material contendo oito grupamentos O-acetila, com relação m/z 1100 $[M+H]^+$. Além disso, outros contaminantes estavam presentes, uma vez que íons de m/z não identificados mostraram-se presentes no espectro da Figura 24 B. O espectro de RMN de 1H desta fração porfirínica mostrou-se de difícil interpretação devido à sua complexidade. Este resultado indicou que apesar da predominância de material porfirínico contendo nove grupamentos O-acetila, esta fração era constituída por uma mistura complexa de porfirinas, provavelmente isômeros de posição. Em conjunto, esses resultados indicam que a lipase de *C. antartica* B não foi capaz de promover uma reação de hidrólise regiosseletiva, considerando-se o material inicial empregado e/ou as condições reacionais utilizadas.

Apesar de não ter sido possível obter de forma isolada as porfirinas provenientes da reação de desacetilação enzimática, optou-se por reservar a fração obtida para realização dos testes de fotoestabilidade e capacidade de geração de oxigênio singleto.

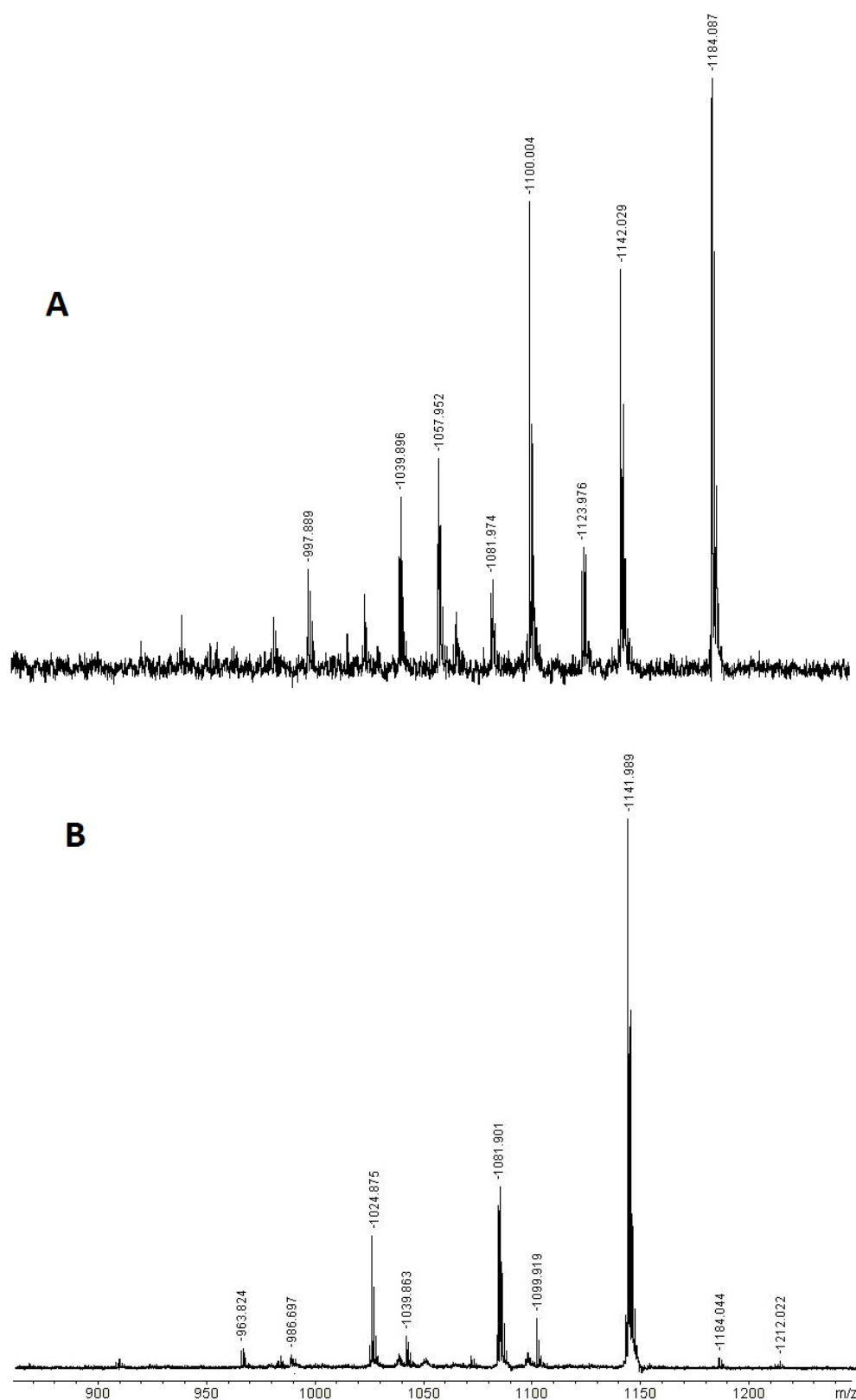


Figura 24: **A-** Espectro de massas de MALDI-TOF da mistura reacional da reação de desacetilação enzimática. **B-** Espectro de massas da reação de desacetilação enzimática, após a purificação.

5.4. Acetilação enzimática

Visando obter porfirinas parcialmente acetiladas, a partir da porfirina totalmente desacetilada **6**, foram realizadas algumas reações-teste, em pequena escala, para posterior emprego das condições escolhidas em reações preparativas. Da mesma forma como anteriormente mostrado, estas reações foram monitoradas pela realização de CCD e posterior espectrometria de massas (MALDI-TOF).

A primeira condição de reação testada consistiu numa condição previamente utilizada pelo grupo de pesquisa em que o presente trabalho vem sendo realizado. Nesta condição (1), utiliza-se um solvente que promova a solubilização adequada do material inicial e acetato de vinila (2:1) e substrato:enzima (2:1), as reações foram realizadas em *viás* partindo de 5 mg da porfirina **6** e 1,5 mL de solvente em *shaker* a 45°C. Desta maneira, observando que o solvente que promove a melhor solubilização da porfirina **6** foi o metanol, esta condição foi utilizada como primeira tentativa de acetilação e os resultados podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7: Resultados da condição 1 de acetilação enzimática.

	Condição		Enzima	Tempo	Produto
72	1	-		48 h	-
73	1	Lipase - CAL-B		48 h	-
74	1	Lipase - Lipozyme RMIM		48 h	-
75	1	Lipase - Lipozyme TLIM		48 h	-
76	1	Lipase - Lipolase 100T		48 h	-
77	1	Amilase - Termamyl 120T		48 h	-
78	1	Lipase - CCL		48 h	-
79	1	Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>		48 h	-

Tendo em vista a presença do álcool metílico como solvente e a estrutura do material inicial porfirina **6**, concluiu-se que este estaria competindo com a porfirina **6** como substrato da enzima, pois esta teria o solvente como substrato preferencial para a acetilação, pois o solvente encontra-se em maior

quantidade em relação à porfirina **6**, comprometendo assim a formação do produto desejado.

Desta maneira, foram desenvolvidas outras duas condições de reação (2 e 3), baseadas nas condições de Sebrão e colaboradores (2011), cujos resultados podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8: Condições das reações de acetilação enzimática.

	Condição	Solvente:substrato	Enzima	Tempo	Produto
80	2	THF: Acetato de vinila (1:1)	CAL-B	48 h	+
81	3	Acetato de vinila (substrato)	CAL-B	48 h	-
82	4	THF: Acetato de vinila* (1:1)	CAL-B	60 h	+

* Adição de surfactante TRITON x 100

Com o monitoramento das reações por CCD e posterior verificação por espectrometria de massas (MALDI-TOF), foi possível observar a formação de uma porfirina portando 2 grupamentos *O*-acetila (m/z 847,8 $[M+H]^+$), através da reação de acetilação de número **80** (Tabela 8), cujo o espectro de massas, pode ser observado na Figura 25.

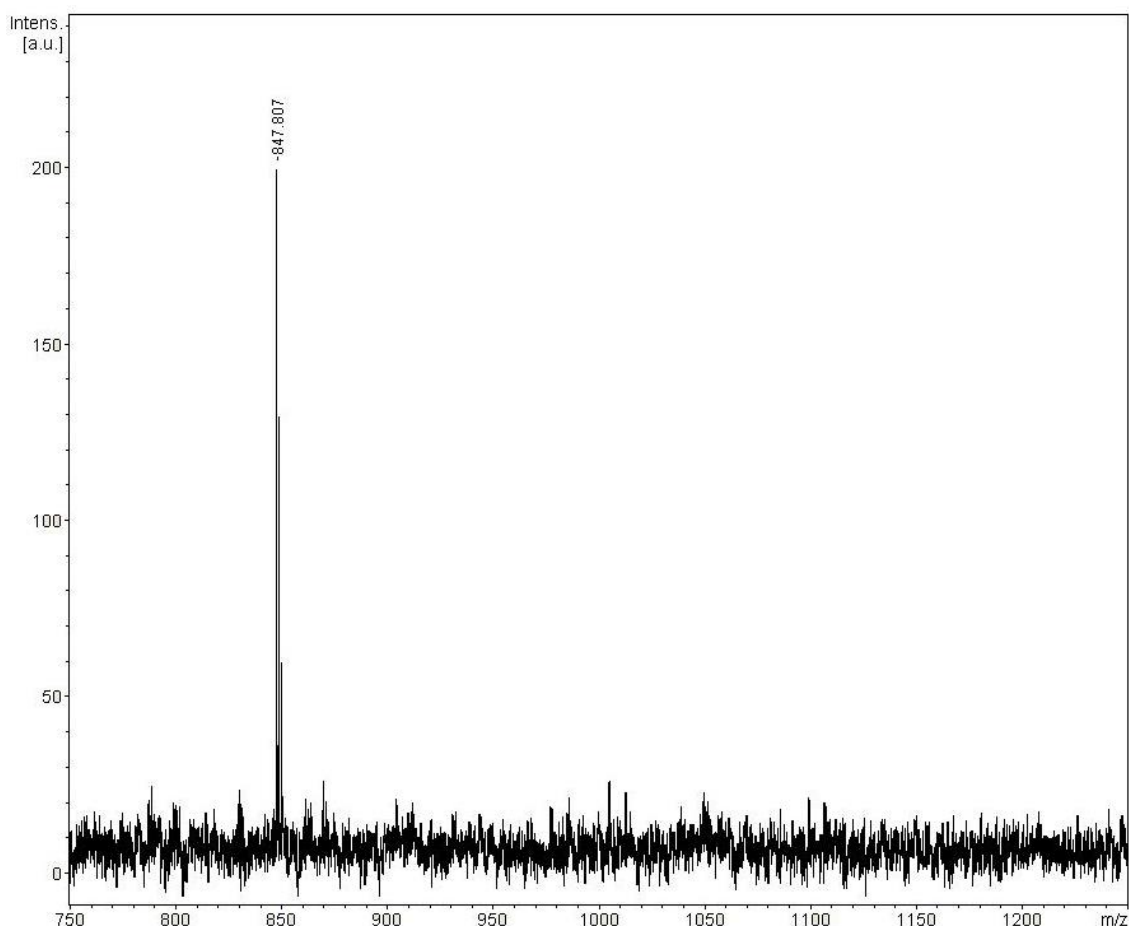
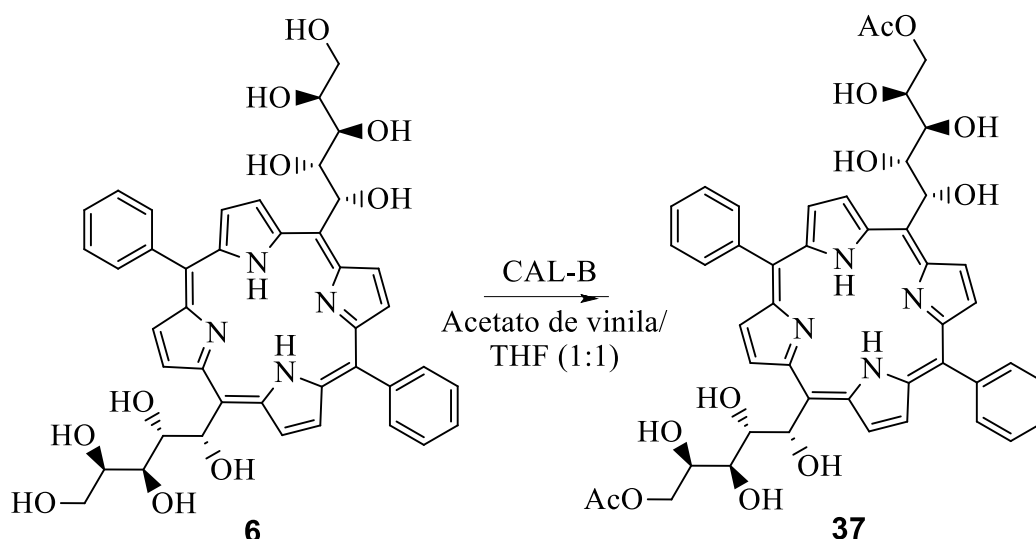


Figura 25: Espectro de massas MALDI-TOF da porfirina di-*O*-acetilada (porfirina **37**).

Esta reação foi repetida em escala aumentada (Anexo 10 – página 133) e então purificada por CCD preparativa e coluna de sílica, utilizando como fase móvel acetato de etila:metanol:água (13:2:1). Este procedimento permitiu o isolamento de uma fração cromatográfica, contendo somente um produto, denominado porfirina **37**, apresentando um rendimento de 53% (Esquema 11). Após cristalização (solubilização em metanol seguida da adição de ciclohexano), a porfirina **37** foi obtida com rendimento de 13%, este material foi utilizado para as análises de RMN por apresentar maior pureza.



Esquema 11: Reação para a obtenção da porfirina **37**.

A caracterização do composto foi realizada com a utilização de espectrometria de ressonância magnética nuclear com experimentos monodimensionais de hidrogênio e carbono e bidimensionais COSY, HSQC e HMBC. A caracterização completa do produto parcialmente acetilado obtido (porfirina **37**) encontra-se no Anexo 10 – página 133. Os dados espectrais de RMN, mono- e bidimensionais, indicaram que a acetilação enzimática ocorreu de forma regiosseletiva, onde os dois grupos O-acetila introduzidos encontraram-se nas duas hidroxilas primárias (terminais) dos resíduos de alditol ligados ao anel porfirínico.

A acetilação seletiva das hidroxilas primárias da porção galactitol da porfirina **37** foi comprovada primeiramente determinando-se a correlação entre $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ e $^1\text{H}/^1\text{H}$, referente à porção alditol, determinada com auxílio dos espectros de HSQC e COSY, respectivamente. Pôde-se observar no HSQC a correlação de dois hidrogênios ao C-5 e um hidrogênio aos demais carbonos da porção alditol, como observado na Figura 27. A determinação da posição das hidroxilas remanescentes foi realizada com o auxílio do espectro COSY, que evidenciou quatro manchas de correlação pertencentes às hidroxilas do C-1 ao C-4. As correlações $^1\text{H}/^1\text{H}$ dos hidrogênios ligados diretamente aos C-2, C-3, C-4 e C-5 estão representadas na Figura 28.

Figura 27: Espectro de correlação $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC da glicoporfirina **37**.

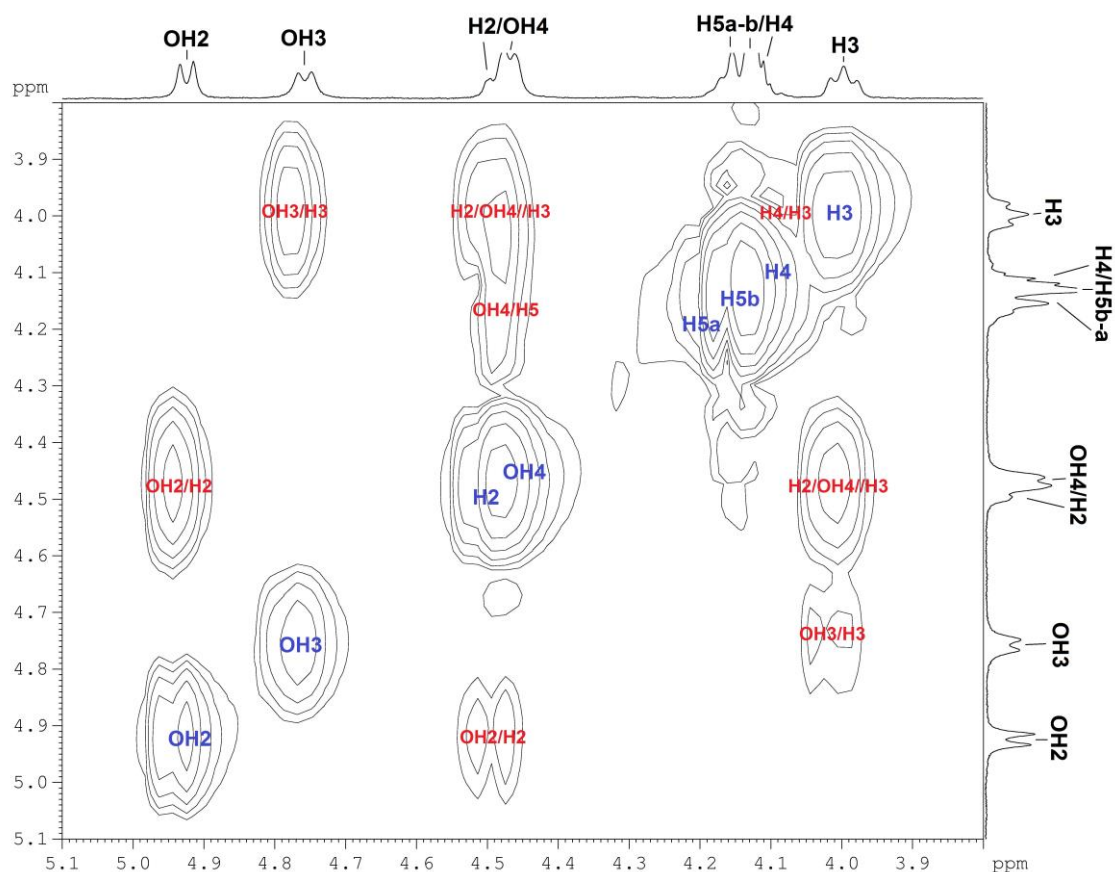


Figura 28: Espectro de correlação $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY da glicoporfirina **37**

A comprovação do correto posicionamento dos grupos *O*-acetila se deu pela realização do HMBC, que mostra a correlação de acoplamento vicinal 3J do carbono carbonílico com os hidrogênios H-5, e do acoplamento geminal 2J entre o carbono carbonílico e os hidrogênios metílicos do grupo *O*-acetila (Figura 29).

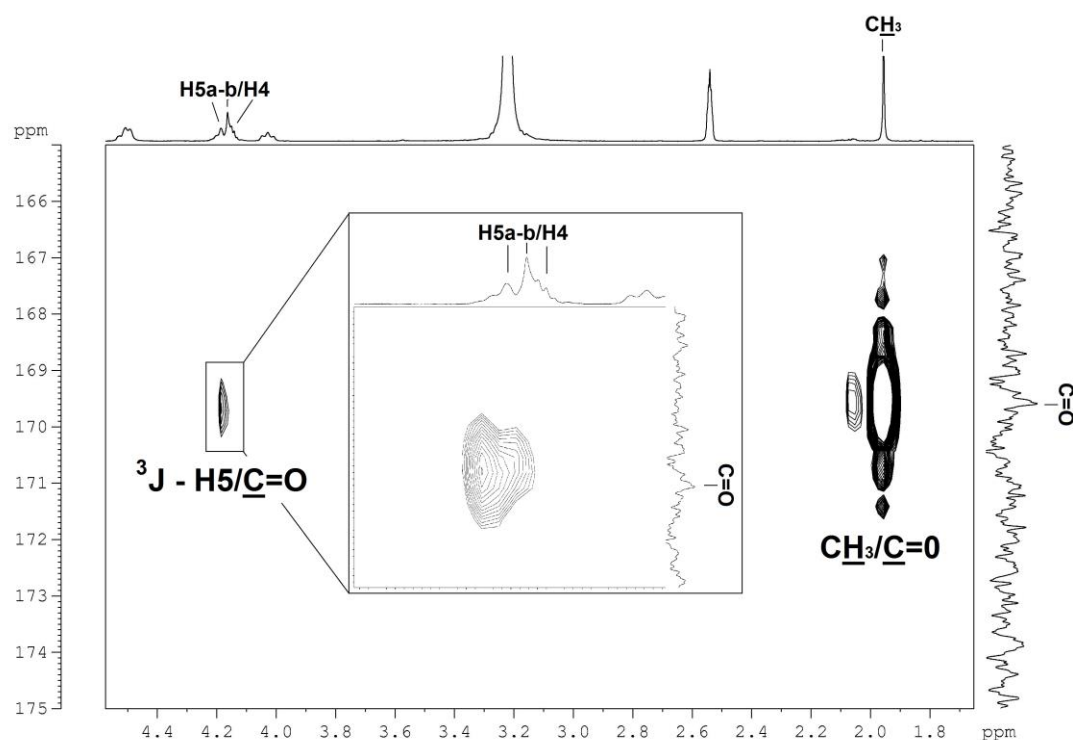
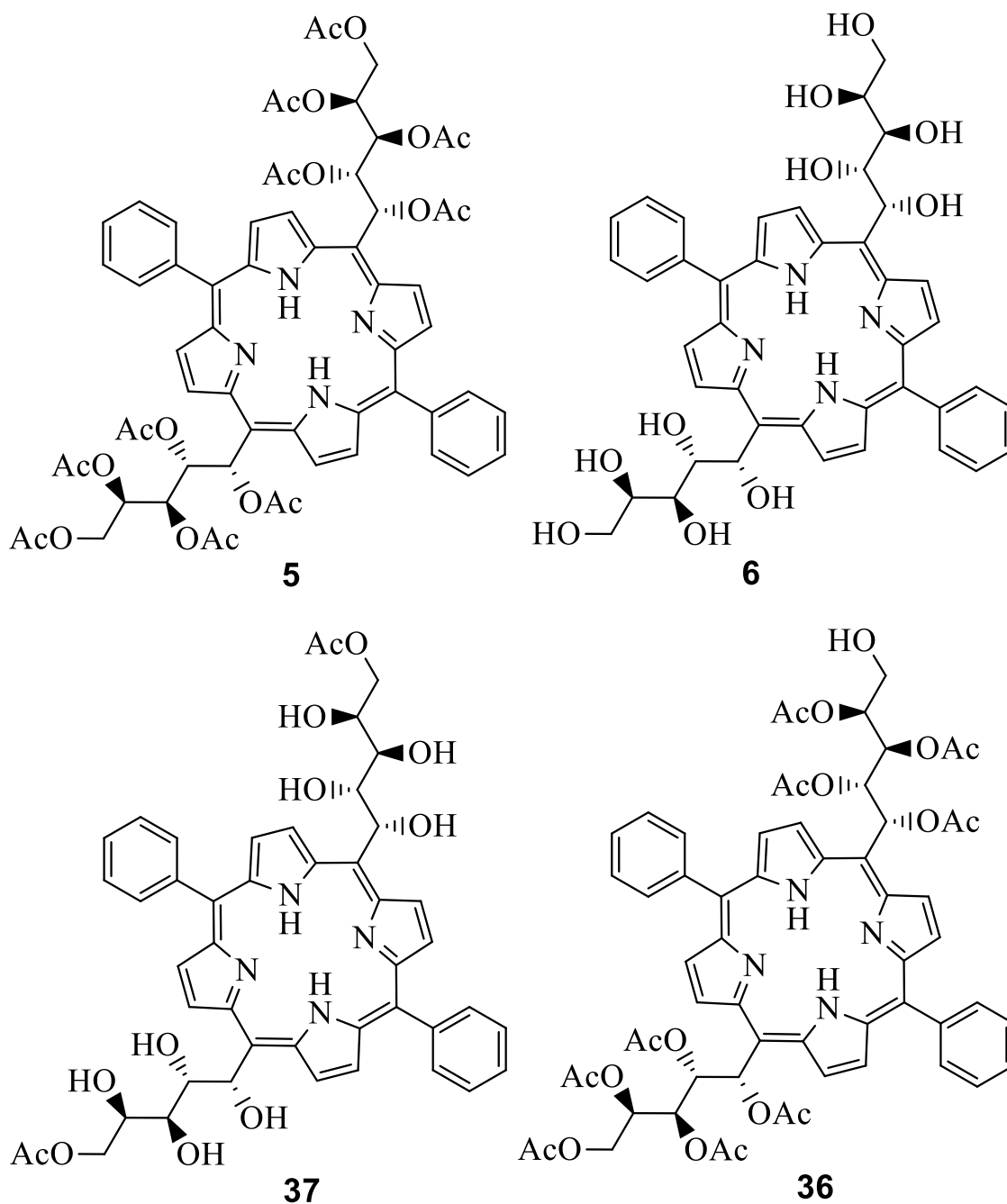


Figura 29: Espectro de correlação de ligações múltiplas $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HMBC da glicoporfirina **37**

De forma contrária à reação de hidrólise, os resultados referentes à reação de acetilação promovida pela lipase de *C. antartica* B, indicaram uma alta regioseletividade. Especificamente a reação de O-acilação foi promovida exclusivamente nas hidroxilas primárias do substrato em questão.

5.5. UV-VISÍVEL E ESTUDOS FOTOFÍSICOS

As porfirinas **5**, **6**, **36** e **37**, obtidas por sínteses desenvolvidas no presente trabalho tiveram seu espectro de UV-Visível avaliado, e foram testadas quanto às suas propriedades fotofísicas.



Desacetilado parcial

Mistura de porfirinas, formada principalmente por uma porfirina (ou mistura) contendo nove grupos OAc

Figura 30: Estrutura das porfirinas avaliadas por espectrometria de UV-Visível e quanto aos quesitos fotofísicos.

5.5.1. UV-Visível

Os espectros de UV-visível das porfirinas sintetizadas não apresentaram diferenças significativas na posição das suas bandas de Soret (Figura 31), além disso, foi possível observar na Figura 32 que todas as porfirinas apresentaram um mesmo padrão de bandas Q.

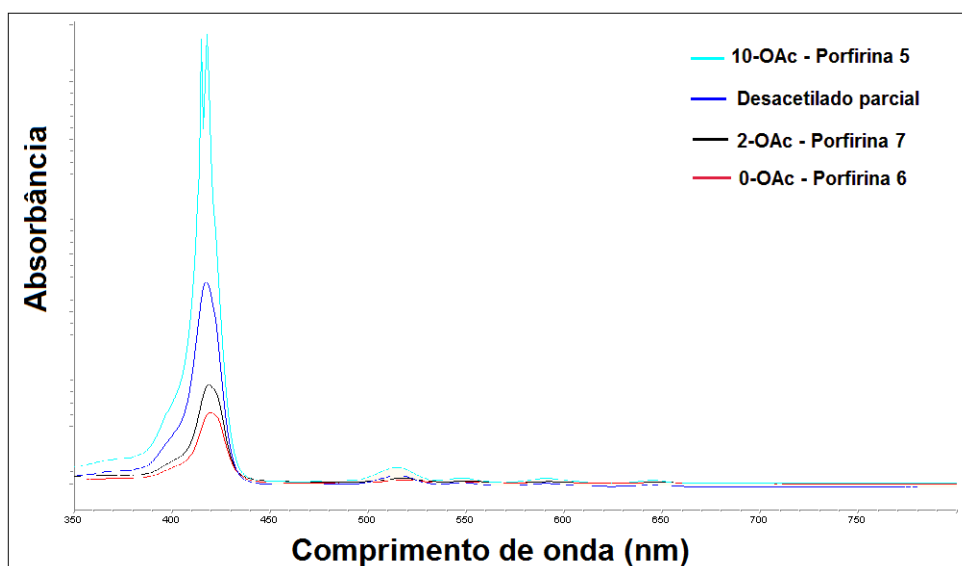


Figura 31: Espectro de UV-Visível das porfirinas sintetizadas (300-800 nm), com observação da banda de Soret.

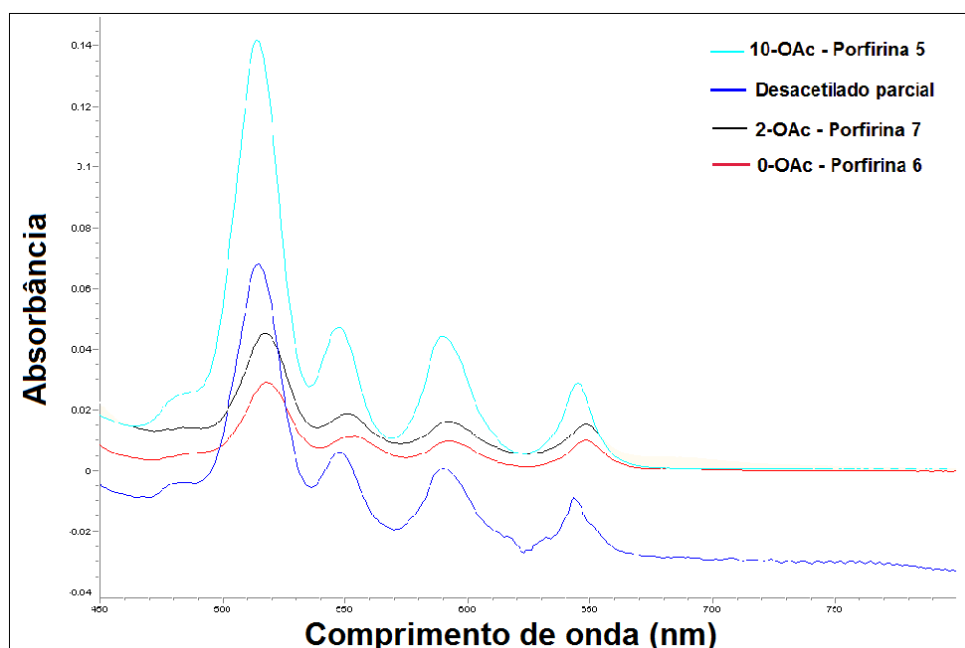


Figura 32: Espectro de UV-Visível das porfirinas sintetizadas (400-750 nm), com observação das bandas Q.

5.5.2. Fotoestabilidade

A verificação da fotoestabilidade das porfirinas foi baseada no decaimento da banda de Soret na presença e ausência de luz, dentro de intervalos de tempo definidos. Além da fotodegradação, outros fatores podem causar o decaimento da banda de Soret, tais como a degradação química da porfirina e a agregação da mesma.

O estudo de fotoestabilidade visa verificar a estabilidade da porfirina em meio aquoso primeiramente na ausência de luz para se assegurar que o decaimento ocorre devido à incidência de irradiação luminosa.

No Gráfico 4, pôde-se observar o decaimento da absorbância no pico máximo da banda de Soret das porfirinas sintetizadas na ausência de luz, observando-se que o decaimento das porfirinas **5**, **6** e do desacetilado parcial **36** foi nulo no escuro. Já no caso da porfirina **37**, foi possível visualizar um decaimento significativo da intensidade da banda Soret (51% de absorbância remanescente).

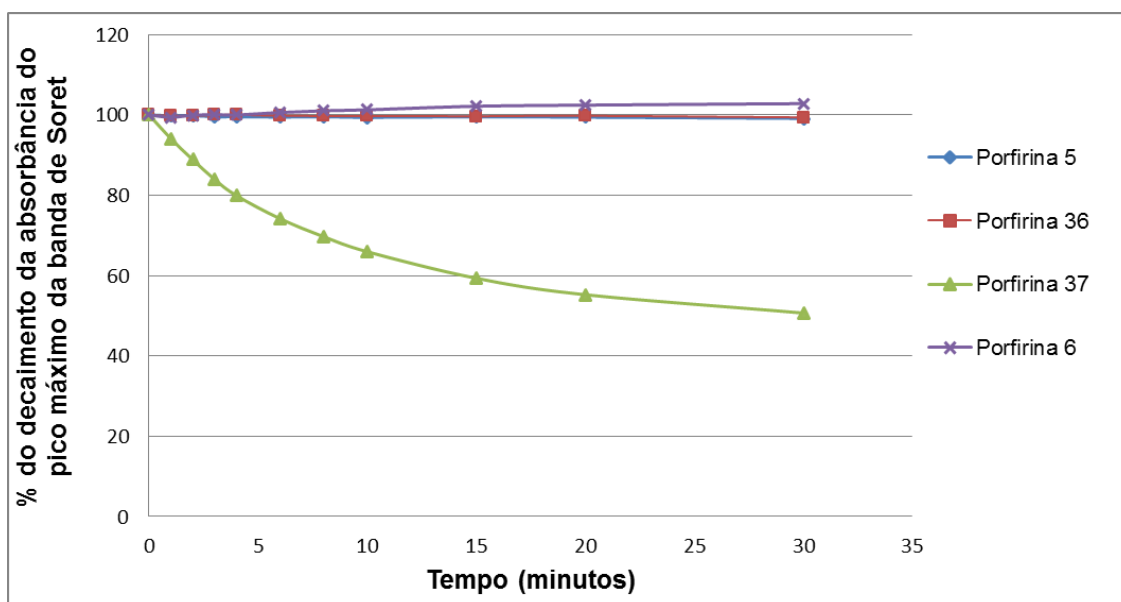


Gráfico 4: Decaimento da absorbância da banda de Soret através do tempo na ausência de irradiação luminosa das porfirinas em solução aquosa.

Considerando o alto decaimento da banda de Soret da porfirina **37**, foi considerada a possibilidade de agregação desta porfirina em meio aquoso.

Para verificação deste fato, o experimento foi realizado em solução aquosa contendo o tensoativo SDS em diferentes concentrações (1, 2, 10 e 100 µg/mL). Ao analisar o gráfico correspondente a essa análise (Gráfico 5), verificou-se que não há uma diferença significativa no decaimento da banda de Soret com a utilização ou não do tensoativo, havendo uma diferença menor do que 10% (valores entre 37 e 51%) comparando com o decaimento da banda de Soret da porfirina em água (49% em 30 minutos).

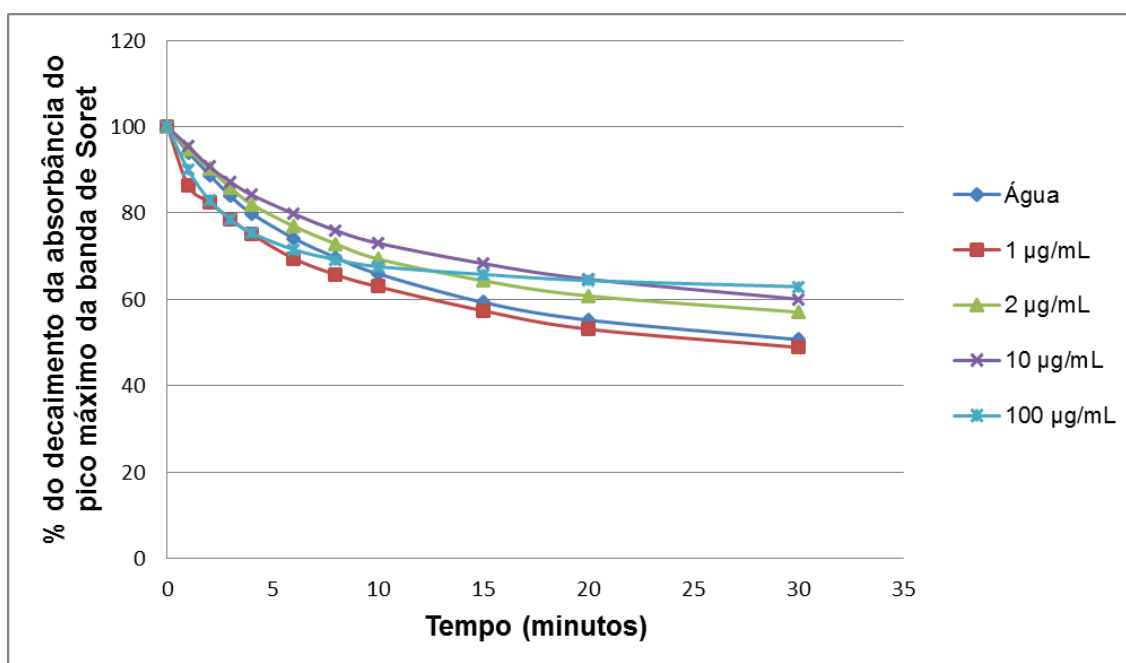


Gráfico 5: Decaimento da absorbância da banda de Soret através do tempo, na ausência de irradiação luminosa das porfirinas em solução contendo diferentes concentrações de SDS.

A análise foi então procedida da mesma maneira, porém, as amostras foram submetidas à irradiação luminosa (100 mW/cm²). Esses resultados podem ser observados no Gráfico 6, onde foi possível verificar que a porfirina **5** totalmente acetilada e o desacetilado parcial **36** são os mais fotoestáveis, apresentando um decaimento máximo da banda de Soret de 5% (porfirina **5**) e 10% (desacetilado parcial **36**). Por outro lado, as porfirinas **6** e **37** não apresentaram fotoestabilidade, mostrando decaimento da banda de Soret de 87 e 90%, respectivamente.

Considerando o fato da porfirina **37** não ser estável na ausência da luz, o resultado foi processado, subtraindo o decaimento da banda de Soret no escuro para verificar o real efeito da luz sobre a porfirina. Este resultado pode

ser observado no Gráfico 7, onde a correção dos resultados indicou que o decaimento da banda de Soret da porfirina **37** atinge 74% (26% de absorbância remanescente), indicando uma baixa fotoestabilidade da molécula.

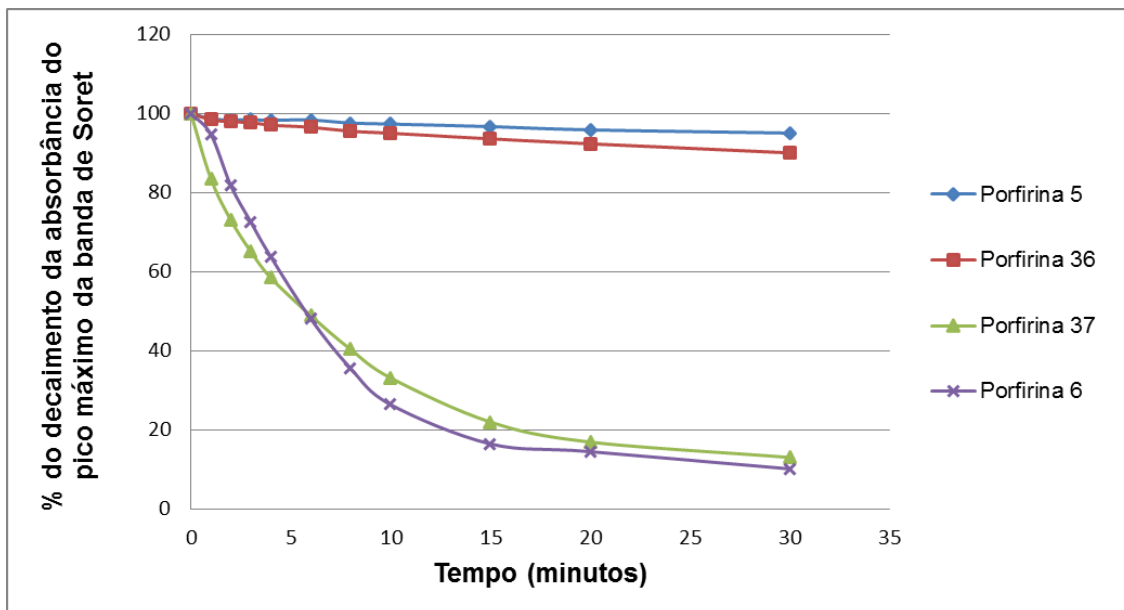


Gráfico 6: Decaimento da absorbância da banda de Soret através do tempo na presença de irradiação luminosa (100 mW/cm^2) das porfirinas em solução aquosa.

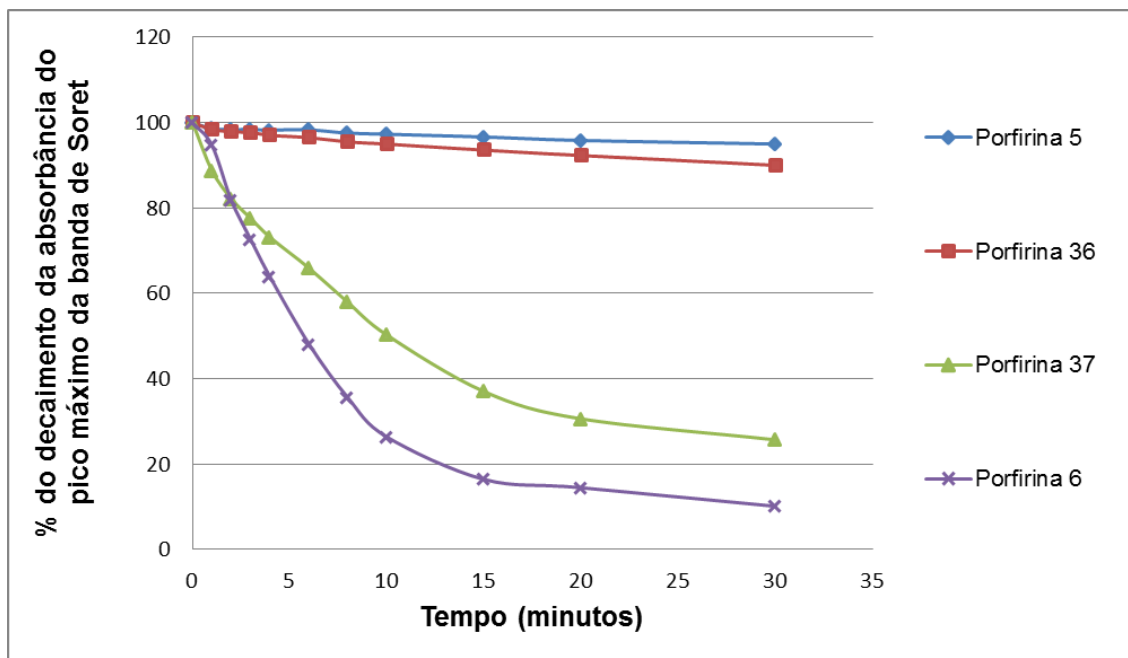


Gráfico 7: Decaimento da absorbância da banda de Soret através do tempo na presença de irradiação luminosa (100 mW/cm^2) das porfirinas em solução aquosa com o valor do decaimento da banda de Soret da porfirina **37** corrigido.

5.5.3. Produção de Oxigênio Singlete

Autores como Beckman e colaboradores (1996) e Zawacka-Pankau e colaboradores (2008) sugeriram que a geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pelas porfirinas e outros fotossensibilizadores é o principal mecanismo para causar fototoxicidade celular, desta maneira, torna-se interessante estudar a produção de oxigênio singlete pelas porfirinas sintetizadas no presente trabalho.

Desta maneira, foi utilizado o método de Hadjur e colaboradores (1998), que consiste num modo indireto de mensuração do $^1\text{O}_2$, onde ocorre a reação entre o 1,3-difenilisobenzofurano (DFiBF) e o $^1\text{O}_2$ gerado pelas porfirinas (Figura 33), originando um endoperóxido que não absorve luz no comprimento de onda 451 nm. Desta forma, quanto menor a absorção neste comprimento de onda, menor a concentração de DFiBF e, conseqüentemente, maior a produção de $^1\text{O}_2$.

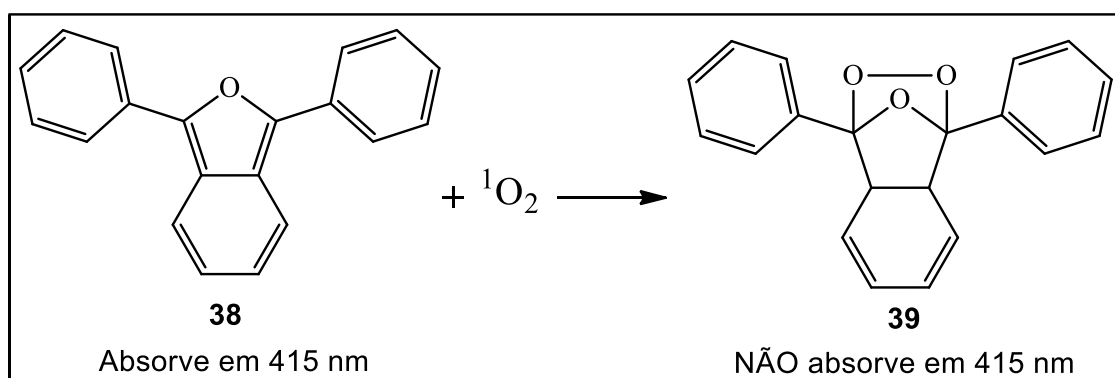


Figura 33: Reação entre o DFiBF e o $^1\text{O}_2$ para a formação de endoperóxido.

Assim, soluções contendo DFiBF (50 $\mu\text{mol/L}$) e porfirina (0,5 $\mu\text{mol/L}$) em DMF:água (9:1) foram submetidas a irradiação luminosa, no comprimento de onda compreendido entre 550 e 800 nm. Pode-se observar no Gráfico 8 o decaimento da absorbância do DFiBF, na presença de porfirinas, o que evidenciou a produção de $^1\text{O}_2$ por todas as moléculas avaliadas no presente trabalho.

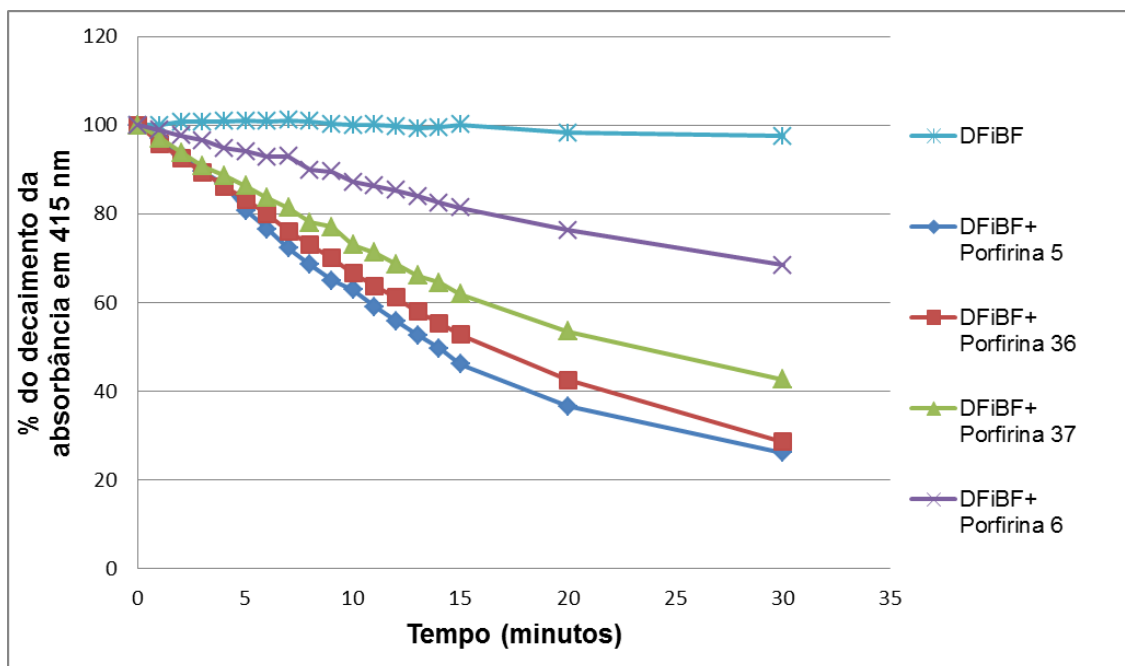


Gráfico 8: Decaimento da absorbância em 415 nm numa solução de DFiBF (50 $\mu\text{mol/L}$) e porfirina (0,5 $\mu\text{mol/L}$) em DMF:água (9:1), após a irradiação à 9 mW/cm^2 , na faixa de comprimento de onda de 550-800 nm.

O Gráfico 8 nos permite observar que a porfirina **5** e o desacetilado parcial **36** produzem maiores quantidades de $^1\text{O}_2$, resultando numa absorbância residual de 26 e 29%, respectivamente, após 30 minutos. As porfirinas **6** e **37** (absorbância residual de 43 e 68%, respectivamente) produziram uma menor quantidade de oxigênio singleto quando comparadas com a porfirina **5** e desacetilado parcial **36**. Este fato pode, possivelmente, ser explicado pela degradação destas porfirinas em contato com a luz, como demonstrado no experimento de fotoestabilidade. Especificamente para a porfirina **37**, uma possível degradação química pode explicar a eficiência mais baixa em produzir $^1\text{O}_2$ singleto, fato que pode ser sustentado pelos experimentos realizados paralelamente à fotoestabilidade, no escuro (Gráfico 4 e Gráfico 5 – páginas 89 e 90).

5.5.3.1. Rendimento quântico de oxigênio singleto

O composto azul de metileno foi utilizado como referência para os cálculos de rendimento quântico de $^1\text{O}_2$, pois este apresenta um rendimento ótimo, considerado 100% (0,52). Para proceder estes cálculos, o procedimento para a verificação de produção de $^1\text{O}_2$ foi realizado com o azul de metileno, DFiBF (50 $\mu\text{mol/L}$) e azul de metileno (0,5 $\mu\text{mol/L}$), baseando-se nos resultados obtidos anteriormente (Gráfico 8).

Para tal, foi plotado um gráfico, utilizando os oito primeiros minutos de análise, comparando os coeficientes angulares, da reta obtida pelo LogN da absorbância do DFiBF no ponto máximo (415 nm), e o tempo de irradiação. Os gráficos obtidos estão representados abaixo (Gráfico 9, Gráfico 10, Gráfico 11, Gráfico 12, Gráfico 13).

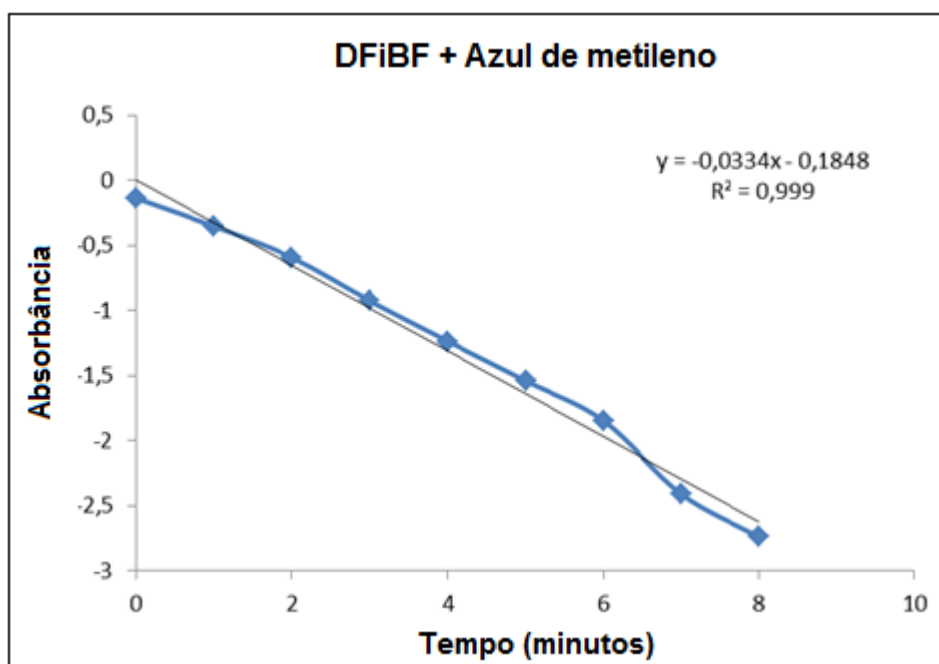


Gráfico 9: Decaimento da absorbância do DFiBF em função da produção de oxigênio singleto pelo azul de metileno.

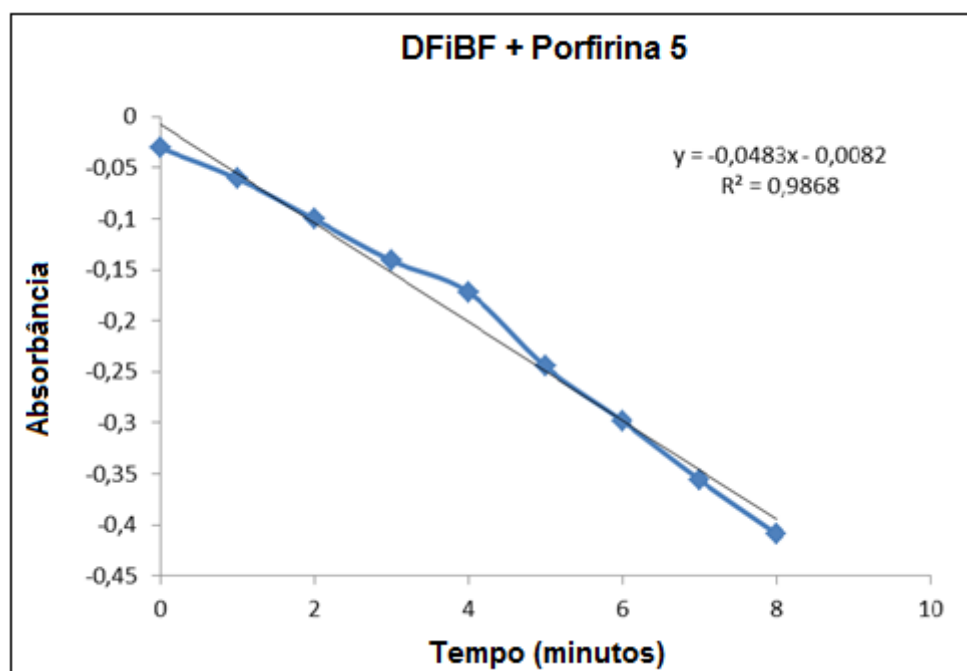


Gráfico 10: Decaimento da absorbância do DFiBF em função da produção de oxigênio singlete pela porfirina **5**.

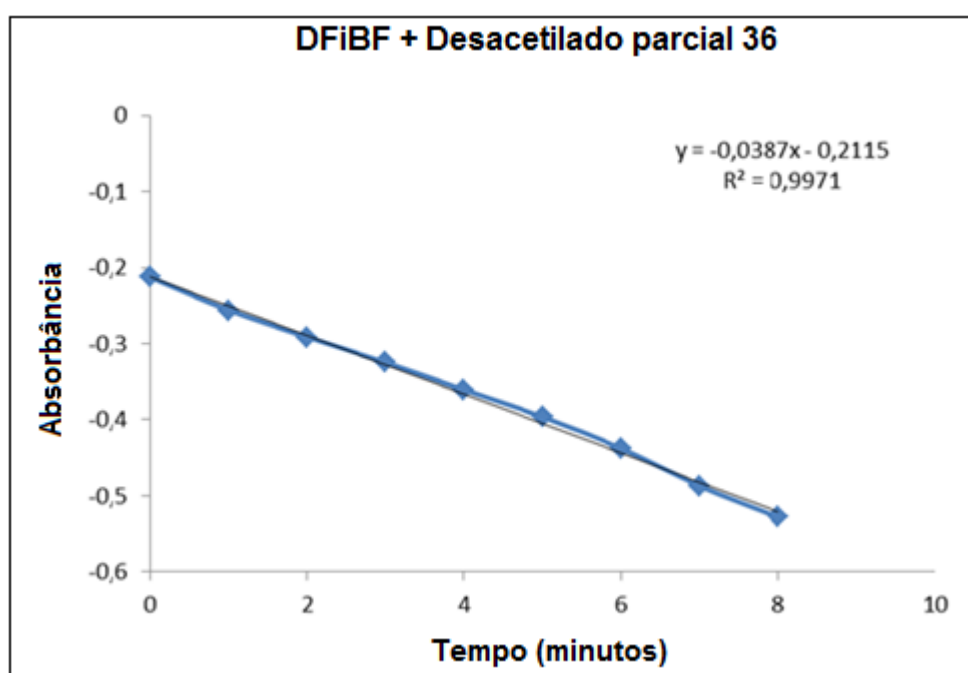


Gráfico 11: Decaimento da absorbância do DFiBF em função da produção de oxigênio singlete pelo desacetilado parcial **36**, composto principalmente por uma porfirina, ou mistura, contendo nove grupamentos O-acetila.

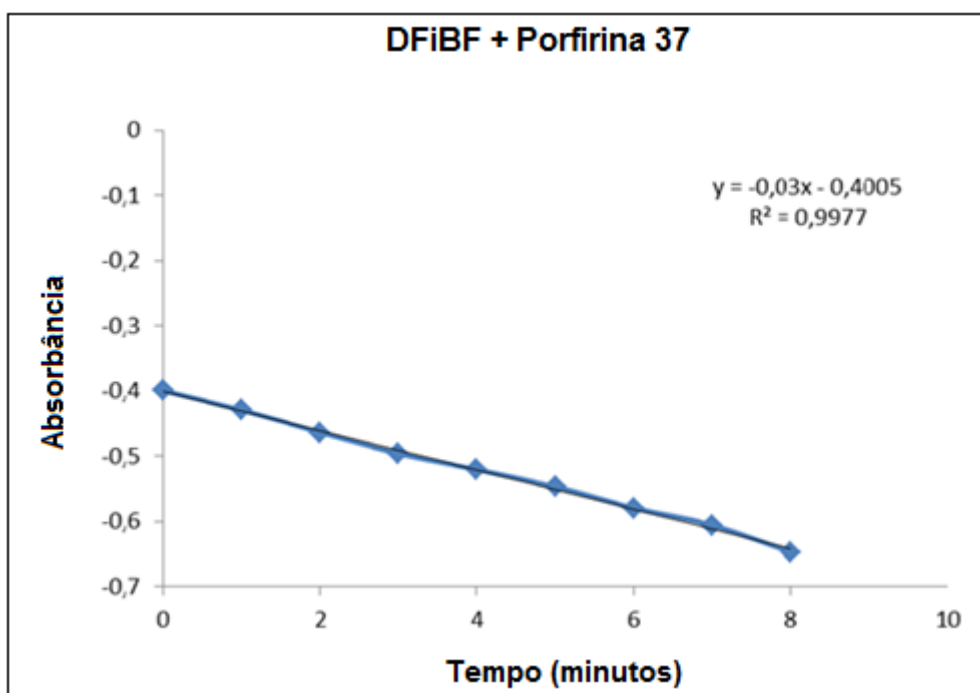


Gráfico 12: Decaimento da absorbância do DFiBF em função da produção de oxigênio singlete pela porfirina 37.

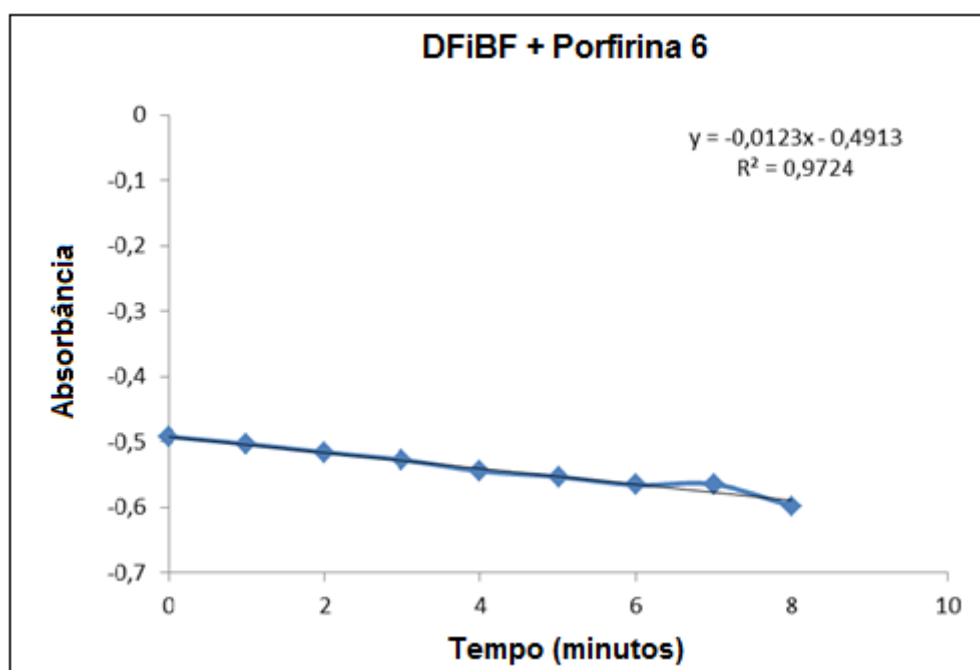


Gráfico 13: Decaimento da absorbância do DFiBF em função da produção de oxigênio singlete pela porfirina 6.

Após obtenção dos gráficos, o cálculo de rendimento de $^1\text{O}_2$ quântico foi processado com auxílio da seguinte equação:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{\text{Padrão}} \frac{R \cdot I_{\text{abs}}^{\text{Padrão}}}{R^{\text{Padrão}} \cdot I_{\text{abs}}} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

Φ_{Δ} - rendimento quântico das porfirinas

$\Phi_{\Delta}^{\text{Padrão}}$ - rendimento quântico do padrão (0,52)

R e $R^{\text{Padrão}}$ - coeficientes angulares do consumo de DFiBF

I_{abs} e $I_{\text{abs}}^{\text{Padrão}}$ - constantes de absorção luminosa

O rendimento de $^1\text{O}_2$ quântico das porfirinas estudadas é mostrado na Tabela 9.

Tabela 9: Rendimento quântico (Φ_{Δ}) de $^1\text{O}_2$ das porfirina **5**, **6**, **37** e desacetilado parcial **36** e coeficiente angular do consumo de DFiBF (R).

	R	Φ_{Δ}
Azul de metileno	0,0334	0,52
10 OAc – Porfirina 5	0,0483	0,77
Desacetilado parcial 36	0,0387	0,56
0 OAc – Porfirina 6	0,0123	0,19
2 OAc – Porfirina 37	0,0300	0,47

Os resultados do rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ das porfirinas **5**, desacetilado parcial **36** e porfirina **37** podem ser considerados ótimos, uma vez que a substância referência apresentou rendimento de 0,52, enquanto as porfirinas **5** e desacetilado parcial **36** apresentam valores maiores (0,77 e 0,56, respectivamente). A porfirina **37** apresentou valor bastante próximo à referência (0,47). Por outro lado, a porfirina **6** apresentou um baixo rendimento quântico de $^1\text{O}_2$, com valor de 0,19.

CONCLUSÕES

No presente trabalho, a porfirina-alditol peracetilada **5** foi obtida de forma eficiente em cinco etapas, com elevado grau de pureza para ser empregada nos estudos de desacetilação química e enzimática

A desacetilação química mostrou-se bastante eficiente, apresentando um rendimento de 67% para a porfirina **6** com a utilização de metóxido de sódio como base para a promoção da desacetilação.

Tanto a porfirina **5** quanto a porfirina **6** foram utilizadas, respectivamente, como substrato para a desacetilação e acetilação enzimática, sendo ambas as reações conduzidas com a lipase imobilizada de *Candida antarctica B* (CAL-B, Novozym 435 – Novozymes®). Outras enzimas foram testadas para estas reações, porém, estas reações não foram satisfatórias quanto à formação dos produtos desejados.

A reação de acetilação enzimática se mostrou altamente regiosseletiva, tendo como único produto de reação uma porfirina contendo dois grupamentos O-acetila, estes localizados nas hidroxilas terminais (primárias) das porções alditol da porfirina **6**, dando origem à porfirina **37**, obtida com um rendimento de 53% (13% após cristalização).

Já a reação de desacetilação enzimática da porfirina **5** não ocorreu de maneira regiosseletiva, gerando preferencialmente uma mistura de produtos contendo nove grupamentos O-acetila, além de outras porfirinas com diferentes graus de acetilação em menor quantidade (desacetilado parcial **36**). Além disso, o isolamento destes produtos de reação pela utilização de coluna cromatográfica e CCD preparativa, não foi conduzido com sucesso, devido aos comportamentos cromatográficos semelhantes dos produtos presentes na mistura obtida.

Os resultados para os experimentos de fotoestabilidade sugeriram que as porfirinas **5** e desacetilado parcial **36** apresentaram alta estabilidade frente a irradiação luminosa, enquanto as porfirinas **37** e **6** não são fotoestáveis. Além disso, a porfirina **37** aparentemente não é estável em meio aquoso. As porfirinas **5**, **37** e desacetilado parcial **36** são altamente eficientes no quesito rendimento quântico de $^1\text{O}_2$, enquanto a porfirina **6** não apresentou resultado

satisfatório. De um modo geral esses resultados apontam para uma influência marcante proporcionada pelas diferenças de substituição pelos grupamentos O-acetila nas propriedades fotofísicas observadas.

Avaliando as características da estrutura química das porfirinas sintetizadas, pode-se afirmar que estas apresentam características de balanço hidrofóbico/hidrofílico diferentes das porfirinas não ligadas a moléculas de carboidratos, desta maneira, devem ser feitos testes em células para avaliar as diferenças nas suas propriedades farmacocinéticas.

Considerando os resultados promissores dos experimentos fotofísicos e os estudos de geração de $^1\text{O}_2$, as moléculas sintetizadas, estas podem ser testadas, numa próxima etapa, em células tumorais para a verificação da sua atividade biológica.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. F.; SALVADOR, V. T.; VITORAZI, L.; GATTS, C. E. N.; SANTOS, D. R.; GIACOMINI, R.; CARDOSO, S. L.; MIRANDA, P. C.M.L. Tuning methyl 4,6-O-benzylidene α -D-glucopyranosides' gelation ability by minor group modifications. **Carbohydrate Research**. n. 353. p. 69-78. 2012.
- ADLER, A. D.; LONGO, F. R.; FINARELLI, J. D.; GOLDMACHER, J.; ASSOUR, J.; KORSAKOFF, L. A Simplified Synthesis for meso-Tetraphenylporphin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 32. p.476-476, 1967.
- ALLISON, R. R; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X. H.; CHILDS, C. J. H.; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. n. 1. p. 27-42, 2004.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly. **American Journal of Physiology**. v. 271. p. C1424-C1437, 1996.
- BELAKHOV, V.; DOVGOLEVSKY, D.; RABKIN, E.; SHULAMI, S.; SHOHAM, Y.; BAASOB, T. Synthesis and evaluation of a mechanism-based inhibitor of KDO8P synthase. **Carbohydrate Research**. n. 339. p. 385-392. 2004.
- BENCZE, L. C.; PAIZS, C.; TOSA, M. I.; IRIMIE, F. D. Sequential use of regio- and stereoselective lipases for the eficiente kinetic resolution of racemic 1-(5-phenylfuran-2-yl)ethane-1,2-diols. **Tetrahedron: Asymmetry**. n. 22. p. 675,683, 2011.
- BONNET, R. Photosensitizers of the por-phy- rin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 24. p. 19-33, 1995.
- BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of PDT in cancer treatment. **Lancet Oncology**. v. 5. p. 497-508, 2004.
- CASIRAGHI, G.; CORNIA, M.; ZANARDI, F.; RASSU, G.; RAGG, E.; BORTOLINI, R. Synthesis and characterization of porphyrin-sugar carbon conjugates. **Journal of Organic Chemistry**, v. 59. p. 1801-1808, 1994.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 1. p. 279-293, 2004.
- CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. n. 78. p. 1-6, 2005.

CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: photochemistry and photobiology. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**. n. 21. p. 293-302, 2007.

CHEN, X.; HUI, L.; FOSTER, D. A.; DRAIN, C. M. Efficient synthesis and photodynamic activity of porphyrin-saccharide conjugates: targeting and incapacitating cancer cells. **Biochemistry**. n. 43. p. 10918-10929, 2004.

CIPOLLA, L.; LOTTI, M.; GIOIA, L.; NICOTRA, F. Application of site-directed lipase mutants on regioselective acylation of monosaccharides. **Journal of Carbohydrate Chemistry**. v. 22. n. 7 & 8. p. 63-644, 2003.

DALLAGNOL, J. C. C.; DUCATTI, D. R. B.; BARREIRA, S. M. W.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; GONÇALVES, A. G. Synthesis of porphyrin glycoconjugates bearing thiourea, thiocarbamate and carbamate connecting groups: Influence of linker on chemical and photophysical properties. **Dyes and Pigments**. n. 107. p. 69-80, 2014.

DEROSA, C. M.; CHUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**. p. 351-371, 2002.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKURAMA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature**. v. 3. p. 380-387, 2003.

DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 90. n. 12. p. 889-905, 1998.

EL-BALDRI, M. H.; WILLENBRING, D.; TANTILLO, D. J.; GERVAY-HAGUE, J. Mechanistic studies on the stereoselective formation of β -mannosides from mannosyl iodides using α -deuterium kinetic isotope effects. **Journal of Organic Chemistry**. n. 72. p. 4663-4672. 2007.

ESMURZIEV, A.; SUNDBY, E.; HOFF, B. H. Regioselective C-6 hydrolysis of methyl O-benzoyl-pyranosides catalysed by *Candida rugosa* lipase. **European Journal of Organic Chemistry**. p. 1592-1597, 2009.

FERNÁNDEZ-HERRERA, M. A.; LÓPEZ-MUÑOZ, H.; HERNÁNDEZ-VÁSQUEZ, J. M. V.; LÓPEZ-DÁVILA, M.; MOHAN, S.; ESCOBAR-SÁNCHEZ, M. L.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, L.; PINTO, B. M.; SANDOVAL-RAMÍREZ, J. Synthesis and biological evaluation of the glycoside (25R)-3 β ,16 β -diacetoxy-22-oxocholest-5-en-26yl- β -D-glucopyranoside: a selective anticancer agent in cervicouterine cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**. n. 46. p. 2877-2886. 2011.

FERRER, M.; SOLIVERI, J.; PLOU, F. J.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; REYES-DUARTE, D.; CHRISTENSEN, M.; COPA-PATÍÑO, J. L.; BALLESTEROS, A. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces*

lanuginosus and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. **Enzyme and Microbial Technology**. n. 36. p. 391-398. 2005.

GARCIA, J.; FERNÁNDEZ, S.; FERRERO, M.; SANGHVI, Y. S.; GOTOR, V. Building blocks for the solution phase synthesis of oligonucleotides: Regioselective hydrolysis of 3',5'-di-O-levulinyl nucleosides using an enzymatic approach. **Journal of Organic Chemistry**. n. 67. p. 4513-4519. 2002.

GARCIA, G.; MARTIN, D. N.; CARREZ, D.; CROISY, A.; MAILLARD, P. Microwave-mediated 'click-chemistry' synthesis of glycoporphyrin derivatives and in vitro photocytotoxicity for application in photodynamic therapy. **Tetrahedron**. n. 67. p. 4924-4932, 2011.

GIOVANNETTI, R. The use of spectrometry UV-Vis for the study of porphyrins. **Macro to Nano Spectroscopy**. n. 6. p. 87-108, 2012.

GOMES, M. C.; BARREIRA, S. M. W.; FAUSTINO, M. A. F.; FERNANDES, R.; NEVES, M. G. P. M. S.; TOMÉ, A. C.; GOMES, N. C. M.; ALMEIDA, A.; CAVALEIRO, J. A. S.; CUNHA, A.; TOMÉ, J. P. C. Photodynamic inactivation of *Penicillium Chrysogenum* conidia by cationic porphyrins. **Photochemical & Photobiological Sciences**. n. 10. p. 1735-1743, 2011.

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **Journal of Organic Chemistry**. n. 62. p. 7512-7515, 1997.

HADJUR, C.; LANGE, N.; REBSTEIN, J.; MONNIER, P.; VAN DEN BERGH, H.; WAGNIERES, G. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta (tetrahydroxyphenyl)chlorine (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. v. 45. p. 170-178, 1998.

HAMBLIN, M. R.; HASA, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease. **Photochemistry and Photobiology Science**. n. 3. p. 436-450, 2004.

HIETANEN, A.; KANERVA, L. T. One-pot oxidation-hydrocyanation sequence coupled to lipase-catalyzed diastereoresolution in the chemoenzymatic synthesis of sugar cyanohydrin esters. **European Journal of Organic Chemistry**. p. 2729-2737, 2012.

IGLESSIAS, A. H. Introdução ao acoplamento cromatografia líquida, espectrometria de massas. **XVII MET – Encontro Nacional sobre Metodologia e Gestão de Laboratórios da Embrapa**. Waters Corporation. 2012.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Tibtech**. v. 16. p. 397-403, 1998.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**. n, 53. p. 315-351, 1999.

JAIN, K.; KESHARWANI, P.; GUPTA, U.; JAIN, N. K. A review of glycosylated carriers for drug delivery. **Biomaterials**. v.33. p. 4166-4186, 2012.

JUARRANZ, A.; JAÉN, P.; RODRÍGUEZ, F. S.; CUEVAS, J.; GONZÁLEZ, S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. **Clinical and Translational Oncology**. n. 10. p. 148-154, 2008.

KAZLAUSKAS, J. R.; WEISSFLOCH, A. N. E.; RAPPAPORT, A. T.; CUCCIA, L. A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Organic Chemistry**. n. 56. p. 2656-2665. 1991.

KIM, M. J.; CHOI, M. Y.; LEE, J. K.; AHN, Y. Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhanced reactivity and regioselectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. n. 26. p. 115-118, 2003.

KUSHWAHA, D.; TIWARI, V. K. Click chemistry inspired synthesis of glycoporphyrin dendrimers. **Journal of Organic Chemistry**. n. 78. p. 8184-8190, 2013.

LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C. G.; VAN MARLE, J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49. p. 2026-2034, 2005.

LAZZERI, D.; ROVERA, M.; PASCUAL, L.; DURANTINI, E. N. Photodynamic studies and photoinactivation of escherichia using meso-substituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution. **Photochemistry and Photobiology**. n. 80. p. 286-293, 2004.

LINDSEY, J. S.; SCHREIMAN, I. C.; HSU, H. C.; KEARNEY, P. C.; MARGUERETTAZ, A. M. Rothmund and Adler-Longo Reactions Revisited: Synthesis of Tetraphenylporphyrins under Equilibrium Conditions. **J. Org. Chem.** v. 52. p. 827-836, 1987.

LJUNGER, G.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Lipase catalyzed acylation of glucose, **Biotechnology Letters**. n. 11. v. 16. p. 1167-1172, 1994.

LÓ, S. M. S.; DUCATTI, D. R. B.; DUARTE, M. E. R.; BARREIRA, S. M. W.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G. Synthesis of meso-tetraarylporphyrins using SeO₂ as oxidant. **Tetrahedron Letters**. n. 52. p. 1441-1443, 2011.

LÓ, S. M. S.; CUNICO, J. C.; DUCATTI, D. R. B.; ORSATO, A.; DUARTE, M. R. B.; BARREIRA, S. M. W.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G. Synthesis of

peracetylated C-1-deoxyalditol- and C-glycoside-dipyrranes via dithioacetal derivatives. **Tetrahedron Letters**. v.54. p. 1137–1140, 2013.

LÓ, S. M. S.; BARREIRA, S. M. W.; GONÇALVES, A. G.; TOMÉ, J. P. C. “Fotoantibióticos” – a luz na fotoinativação de micro-organismos. **Revista Virtual de Química**. n. 1. v. 7, 390-402, 2015.

MAGNUSSON, A. Rational redesign of *Candida Antarctica* lipase B. **KTH Biotechnology**. 2005.

MICHIATA. N.; KANEKO, Y.; KASAI, Y.; TANIGAWA, K.; HIROKANE, T.; HIGASA, S.; YAMADA, H. High-yeld total synthesis of (-)-stricnin trthough intramolecular coupling of gallartes. **Journal of Organic Chemistry**. v. 78. p. 4319-4382. 2013.

MIKATA, Y.; ONCHI, Y.; SHIBATA, M.; KAKUCHI, T.; ONO, H.; OGURA, S.; OKURA, I.; YANOA, S. Synthesis and phototoxic property of tetra- and octa'glycoconjugate tetraphenylchlorins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 8. p. 3543-3548, 1998.

MIKATA, Y.; ONCHI, Y.; TABATA, K.; OGURA, S.; OKURA, I.; ONO, H.; YANOA, S. Sugar-dependent photocytotoxic property of tetra- and octa-glycoconjugated tetraphenylporphyrins. **Tetrahedron Letters**. v. 39. p. 4505-4508, 1998.

MILGROM, L. R. **The Colours of Life**. Oxford: Oxford University Press, 1996.

MINNOCK, A.; VERNON, D. I.; SHOFIELD, J.; GRIFFIHS, J.; PARISH, J. H.; BROWN, S. B. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. v. 32. p. 159-164, 1996.

O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. **Photochemistry Photobiology**. v. 85. p.1053-1074, 2009.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J. L.; VERSCHUEREN, K. H. G.; GOLDMAN, A. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering**. v. 5. n. 3. p. 197-211. 1992.

PERCEC, V.; LEOWANAWAT, P.; SUN, H. J.; KULIKOV, O.; NUSBAUM, C. D.; TRAN, T. M.; BERTIN, A.; WILSON, D. A.; PETERCA, M.; ZHANG, S.; KAMAT, N. P.; VARGO, K.; MOOCK, D.; JOHNSTON, E. D.; HAMMER, D. A.; POCHAN, D. J.; CHEN, Y. M.; CHABRE, Y.; SHIAO, T. C.; BERGERON-BRLEK, M.; ANDRÉ, S.; ROY, R.; GABIUS, H. J.; HEINEY, P. A. Molecular synthesis of amphiphilic janus glycodendrimers and their self-assembly into glycodendrimersomes and other complex architectures with bioactivity to

biomedically relevant lectins. **Journal of American Chemical Society**. v. 135. p. 9055-9077. 2013.

PEREIRA, M. A.; FAUSTINO, M. A. F.; TOMÉ, J. P. C.; NEVES, M. G. P. M. S.; TOMÉ, A. C.; CAVALEIRO, J. A. S.; CUNHA, A.; ALMEIDA, A. Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin. **Royal Society of Chemistry. Photochemical & Photobiological Sciences**. n. 13. p. 680-690. 2014.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de micro-organismos. **Química Nova**. v. 30. n. 4. p. 988-994, 2007.

PLOU, F. J.; CRUCES, M. A.; FERRER, M.; FUENTES, G.; PASTOR, E.; BERNABÉ, M.; CHRISTENSEN, M.; COMELLES, F.; PARRA, J. L.; BALLESTEROS, A. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. **Journal of Biotechnology**. n. 96. p. 55-66, 2002.

PRASAD, A. K.; SERENSEN, M. D.; PARMAR, V. S.; WENGEL, J. Tri-O-acyl 2-deoxy-D-ribofuranose: an effective enzyme-assisted one-pot synthesis from 2-deoxy-D-ribose and transformation into 2'-deoxynucleosides. **Tetrahedron Letters**. n. 34. v. 36. p. 6163-6166, 1995.

PRASAD, A. K.; MUKHERJEE, C.; SHARMA, D.; RASTOGI, S.; MANGALAM, A.; JHA, A.; OLSEN, C. E.; PATKAR, S. A.; PARMAR, V. S. Synthesis and lipase-catalyzed resolution studies on novel (\pm)-2-(2-acetoxyethyl)-4-arylmethyl-3-oxo-3,4-dihydri-2H-1,4-benzoxazine-6-carboxylates. **Journal of Molecular Catalysis**. n. 40. p. 101-110. 2006.

RAMINELLI, C.; COMASSETO, J. V.; ANDRADE, L. H.; PORTO, A. L. M. Kinetic resolution of propargylic and allylic alcohols by *Candida antarctica* lipase (Novozyme 435). **Tetrahedron: Asymmetry**. n. 15. p. 3117-3122. 2004.

ROTHEMUND, P. A New Porphyrin Synthesis. The Synthesis of Porphin. **Journal of American Chemistry Society**. v. 58, p.625-627, 1936.

SEBRÃO, D.; SÁ, M. M.; NASCIMENTO, M. G. Regioselective acylation of D-ribo-1,4-lactone catalyzed by lipases. **Process Biotechnology**. n. 46. p. 551-556, 2011.

SHARMA, R. K.; AGGARWAL, N.; ARYA, A.; OLSEN, C. E.; PARMAR, V. S.; PRASAD, A. K. Lipase-catalyzed region- and stereoselective deacylation: Separation of anomers of peracylated α,β -D-ribofuranosides. **Indian Journal of Chemistry**. v. 48B. p. 1727-1731, 2009.

SHARMA, V. K.; KUMAR, M.; SHARMA, D.; OLSEN, C. E.; PRASAD, A. K. Chemoenzymatic synthesis of C-4'-spiro-oxetanoribonucleosides. **The Journal of Organic Chemistry**. n. 79. p. 8516-8521. 2014.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics basic principles and clinical applications. **Drug Discovery Today**. v. 4. n. 11. p. 507-517, 1999.

SINGH, S. K.; SHARMA, V. K.; BOHRA, K.; OLSEN, C. E.; PRASAD, A. K. Biocatalytic deacytation studies on tetra-O-acyl- β -D-xylofuranosyl nucleosides: synthesis of xylo-LNA monomers. **The Journal of Organic Chemistry**. n. 76. p. 7556-7562. 2011.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN D. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**. v. 54. p. 4151-4202, 1998.

STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA. A. Rapid Chromatography Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. **Journal of Organic Chemistry**. v.43. p. 2923-2925, 1978.

STOYTCHIEVA, M.; MONTERO, G.; ZLATEV, R.; LEÓN, J. Á.; GOCHEV, V. Analytical methods for lipases activity determination: a review. **Current Analytical Chemistry**. v. 8. p. 400-407. 2012.

TERRINI, M.; SALVETTI, R.; LINATI, L.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; BASTIDA, A.; GUISAN, J. M. Regioselective enzymatic hydrolysis of acetylated pyranoses and pyranosides using immobilised lipases. An easy chemoenzymatic synthesis of α - and β -D-glucopyranose acetates bearing a free secondary C-4 hydrozyl group. **Carbohydrate Research**. v. 337. p. 1615-1621, 2002.

TISS, A.; CARRIÈRE, F.; VERGER, R. Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. **Analytical Biochemistry**. n. 1. p. 36-43, 2001.

TOMÉ, J. P. C.; NEVES, M. G. P. M. S.; TOMÉ, A. C.; CAVALEIRO, J. A. S.; SONCIN, M.; MAGARAGGIA, M.; FERRO, S.; JORI, G. Synthesis and antibacterial activity of new poly-s-lysine-porphyrin conjugates. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 47. n. 26. p. 6649-6652, 2004.

TOMÉ, J. P. C.; NEVES, M. G. M. S.; TOMÉ, A. C.; CAVALEIRO, J. A. S.; MENDONÇA, A. F.; PEGADO, I. N.; DUARTE, R.; VALDEIRA, M. L. Synthesis of glycoporphyrin derivatives and their antiviral activity against herpes simplex virus types 1 and 2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. n. 13. p. 3878-3888, 2005.

TOMÉ, J. P. C.; SILVA, E. M. P.; PEREIRA, A. M. V. M.; ALONSO, C. M. A.; FAUSTINO, M. A.; NEVES, M. G. P. S.; TOMÉ, A. C.; CAVALEIRO, J. A. S.; TAVARES, S. A. P.; DUARTE, R. R.; CAEIRO, M. F.; VALDEIRA, M. L. Synthesis of neutral and cationic tripyridylporphyrin-D-galactose conjugates and the photoinactivation of HSV-1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. n. 15. p. 4705-4713, 2007.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Current Biology**. n. 2. p. 293-308. 1994

UPPENBERG, J.; ÖHRNER, N.; NORIN, M.; HULT, K.; KLEYWEGT, G. J.; PATKAR, S.; WAAGEN, V.; ANTHINSEN, T.; JONES, A. Crystallography and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. **Biochemistry**. n. 34. p. 16838-16851. 1995.

WAINWRIGHT, M.; MOHR, H.; WALKER, W. H. Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. n. 86. p. 45-58, 2007.

WANG, F.; CHEN, Z. G.; ZHU, H. J. An efficient enzymatic modification of lily polysaccharide in ionic liquid under ultrasonic irradiation. **Biochemical Engineering Journal**. n. 79. p. 25-28, 2013.

XING, C.; XU, Q.; TANG, H.; LIU, L.; WANG, S. Conjugated polymer/porphyrin complexes for efficient energy transfer and improving light-activated antibacterial activity. **Journal of American Chemistry Society**. n. 131. p. 13117-13124, 2009.

ZAWACKA-PANKAU, J.; KRACHULET, J.; GRULKOWSKI, I.; BIELAWSKI, P.; SELIVANOVA, G. The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: recent advances. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 232. p. 487-497, 2008.

ZHENG, X.; PANDEY, R. K. Porphyrin-carbohydrate conjugates: impact of carbohydrate moieties in photodynamic therapy (PDT). **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**. n. 8. p. 241-268, 2008.

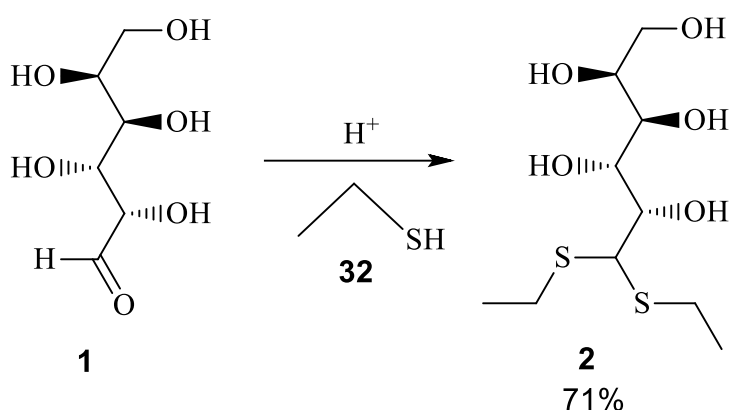
ANEXOS

Anexo 1: D-galactose dietilditioacetal (2)	110
Anexo 2: 2,3,4,5,6-penta- O-acetil-D-galactose dietilditioacetal (3).....	112
Anexo 3: 2,3,4,5,6-penta- O-acetil-1-desoxi-1,1-dipirril-D-galactitol (4).....	114
Anexo 4: 5,15-[bis(fenil)]-10,20-[bis(1-desoxi)-2,3,4,5,6-penta- O-acetil-D-galactitol]porfirina (5).....	116
Anexo 5: Reação de desacetilação química número 3 (Tabela 1)	121
Anexo 6: Reação de desacetilação química número 13 (Tabela 1).	122
Anexo 7: Metodologia para as tentativas de desacetilação química 18 e 19 (Tabela 1).	123
Anexo 8: Reação de desacetilação química	124
Anexo 9: Reação de desacetilação enzimática	129
Anexo 10: Reação de acetilação enzimática (obtenção da porfirina 37)	133

Anexo 1: D-galactose dietilditioacetal (**2**)

A galactose dietilditioacetal **2** foi obtida a partir da reação entre 2 g (11,1 mmol) de galactose **1** e 3 mL (97,9 mmol) de HCl concentrado a 0°C sob agitação, sendo em seguida adicionado lentamente 2 mL (27,8 mmol) de etanotiol **32**. Após 30 minutos de reação ocorreu então a formação de uma massa branca. A reação foi interrompida pela adição de gelo e água gelada ao meio reacional e o material obtido foi filtrado, lavado com água gelada e cristalizado em 20 mL de etanol 95% a quente. Os cristais formados foram coletados por filtração e secos a temperatura ambiente. O composto **2** foi obtido com um rendimento de 71%.

RMN ^1H a 30°C (CD_3OD – 200,1 MHz) δ (ppm): 4,15 (dd, $J=1,3$ e $9,2$ Hz, 1H, H3); 4,09 (d, $J=9,4$ Hz, 1H, H1); 3,91 (dd, $J=1,4$ e $5,7$ Hz, 1H, H5); 3,90 (dd, $J=1,3$ e $21,2$ Hz, 1H, H2); 3,66 (dd, $J=1,6$ e $9,2$ Hz, 1H, H4); 3,66 (s, 1H, H6a); 3,63 (s, 1H, H6b); 2,72 (m, 4H, CH_2CH_3); 1,26 (m, 6H, CH_2CH_3).



Esquema 12: Síntese da galactose dietilditioacetal **2**.

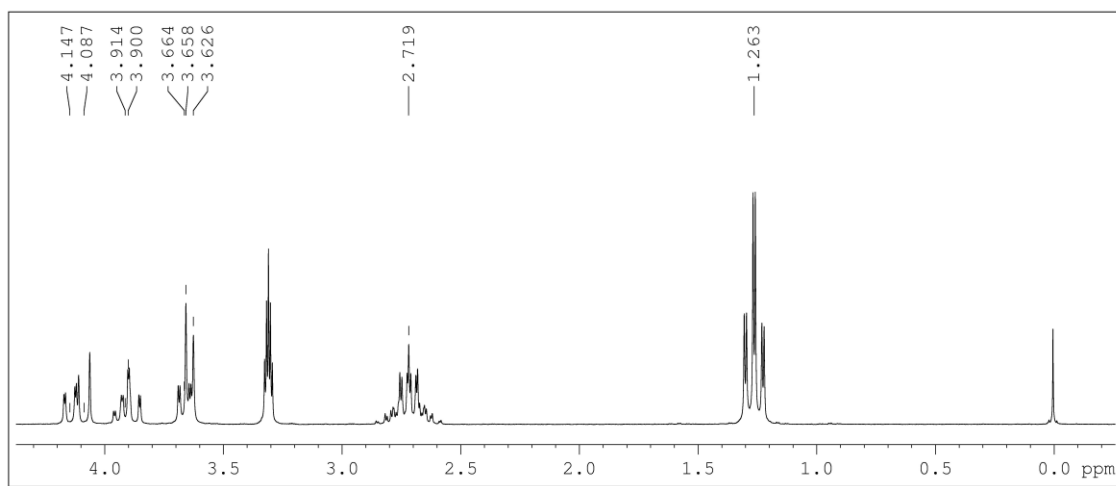
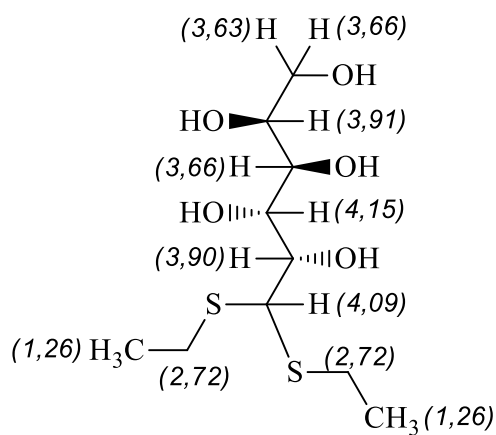
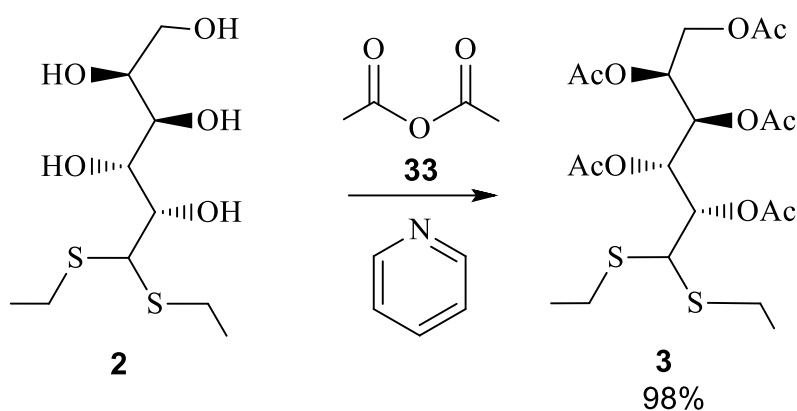


Figura 34: Espectro de RMN ^1H a 30°C (CD_3OD – 200,1 MHz) da galactose dietilditioacetal **2**, calibrado em 3,31 (CD_3OD) e molécula com atribuições.

Anexo 2: 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-galactose dietilditioacetal (3)

O composto **3** foi obtido pela reação entre 1,30 g (4,6 mmol) do composto **2** dissolvido em 4,5 mL (55,9 mmol) de piridina, a 0 °C sob agitação. Após a solubilização do composto **2** foi adicionado 6,5 mL (68,8 mmol) de anidrido acético **33**. A mistura foi mantida a 0 °C por uma hora e posteriormente a temperatura ambiente por 18 horas. Foram adicionados aproximadamente 200 mL de gelo para finalizar a reação, o que levou à cristalização do produto na forma de cristais brancos, os quais foram filtrados e secos a temperatura ambiente. O composto **3** foi obtido com um rendimento de 98%.

RMN ^1H a 30°C (CDCl_3 – 200,1 MHz) δ (ppm): 5,78 (dd, $J=1,8$ e 9,5 Hz, 1H, H3); 5,23 (m, 1H, H4); 5,19 (m, 1H, H5); 5,16 (m, 1H, H2); 4,29 (dd, $J=4,5$ e 11,7 Hz, 1H, H6a); 3,85 (b, 1H, H6b); 3,83 (b, 1H, H1); 2,65 (m, 4H, CH_2CH_3); 2,13 (s, 3H) 2,11 (b, 9H), 2,02 (s, 3H) (COCH_3); 1,23 (m, 6H, CH_2CH_3).



Esquema 13: Síntese do 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-galactose dietilditioacetal **3**.

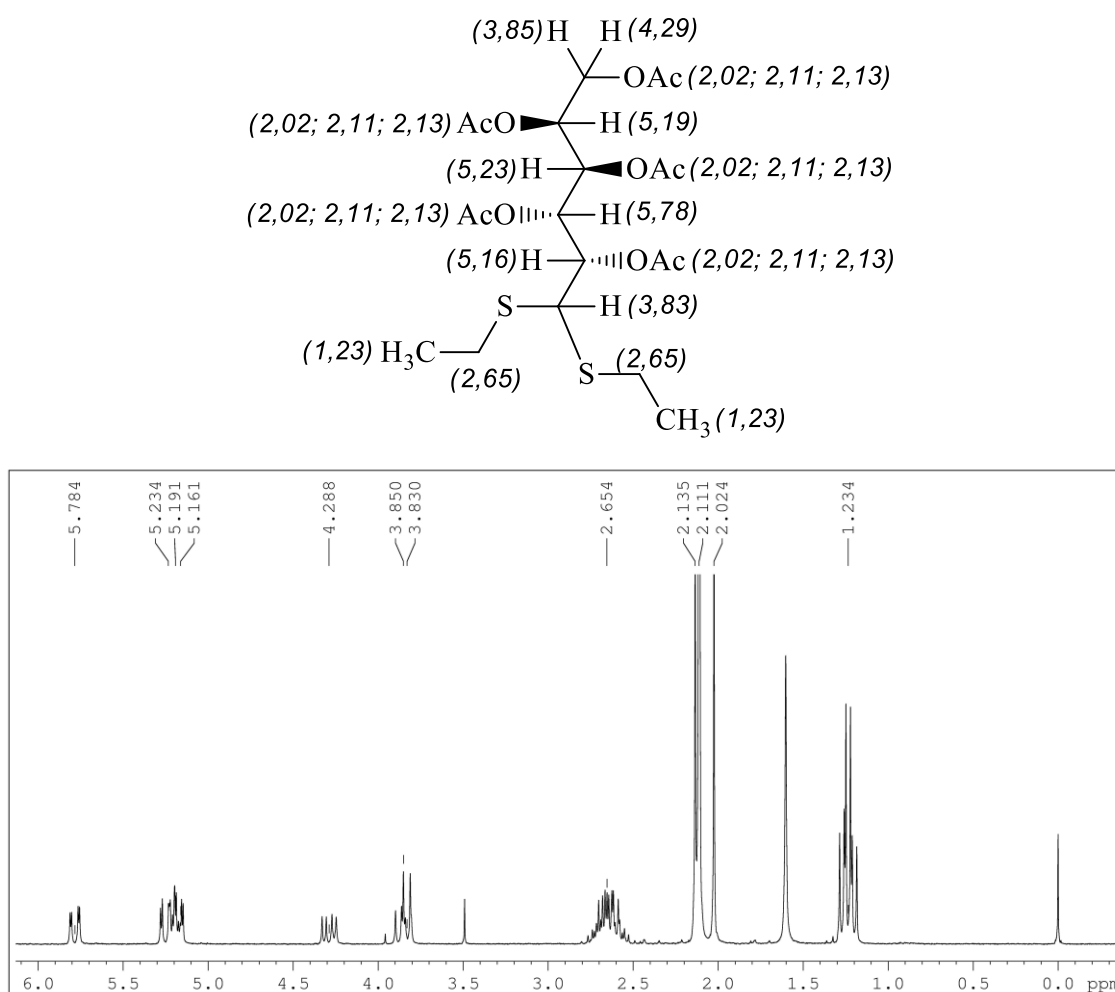
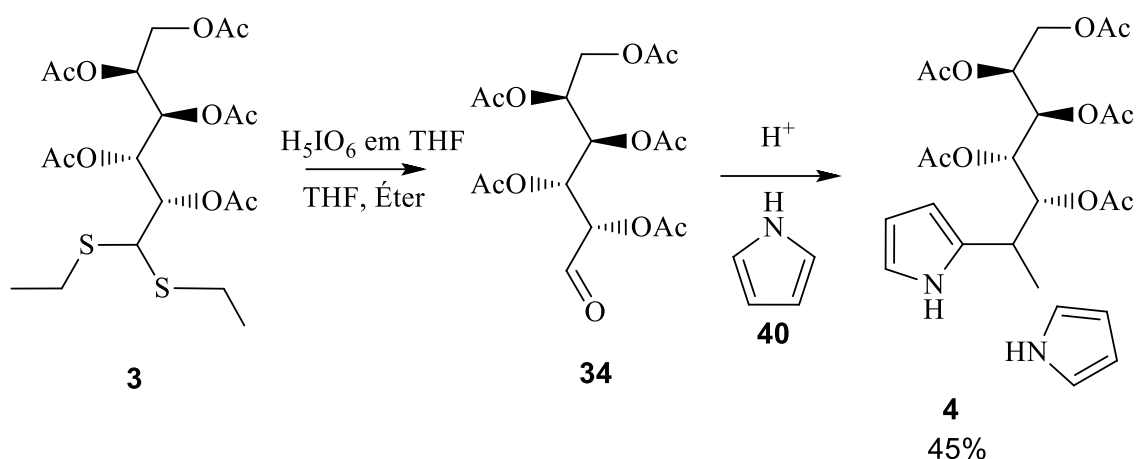


Figura 35: Espectro de RMN ^1H a 30°C (CDCl_3 – 200,1 MHz) da 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-galactose dietilditioacetal **3**, calibrado em 7,27 (CDCl_3) e molécula com atribuições.

Anexo 3: 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-1-desoxi-1,1-dipirril-D-galactitol (4)

Primeiramente, o 2,3,4,5,6-penta-O-acetilaldeído-D-galactose **34** foi obtido pela reação de 5,0 g (10,1 mmol) do composto **3**, solubilizado em 50 mL de éter etílico e 20 mL de THF, e lenta adição de uma solução de 4,6 g (20,1 mmol) de H_5IO_6 em 10 mL de THF. A reação foi mantida sob agitação, à 0°C por 20 minutos. Posteriormente, o meio reacional foi diluído com tampão fosfato (0,1 mol/L; pH 7,0) e extraído com CH_2Cl_2 . A fase orgânica foi lavada com solução aquosa de Na_2SO_3 10% (m/v), seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O aldeído **34** formado foi obtido com rendimento bruto de 98%. Ao aldeído **34** contido no balão, foi adicionado 17 mL (0,245 mol) de pirrol **40** e 77 μL (1 mmol) de TFA em solução (1:10). A reação foi submetida à troca de atmosfera por argônio e mantida sob agitação, a 30°C por 30 minutos. O meio reacional foi diluído com clorofórmio e lavado com solução de NaOH 0,1 mol/L, seco com Na_2SO_4 anidro, filtrado e evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna de sílica, utilizando como eluente acetato de etila/ciclohexano (1:1). O produto puro foi obtido como cristais brancos após a concentração do material obtido da coluna. Estes cristais foram então lavados com etanol 98% gelado, filtrados e secos a TA. O composto **4** foi obtido com um rendimento de 45%.

RMN ^1H a 30°C (DMSO- d_6 200,1 MHz) δ (ppm): 10,44 (d, $J=40,4$ Hz, 2H, NH); 6,56 (b, 2H, H1, pirrol); 5,91 (b, 2H, H2 pirrol); 5,81 (b, 2H, H1', pirrol); 5,54 (d, $J=9,8$ Hz, 1H, H3); 5,12 (dd, $J=2,9$ e 8,1 Hz, 1H, H2); 5,08 (d, $J=1,4$ Hz, 1H, H4); 5,02 (b, 1H, H5); 4,16 (b, 1H, H1); 4,13 (b, 1H, H6a); 3,82 (dd, $J=6,1$ e 11,9 Hz, 1H, H6b); 2,04; 1,99; 1,93; 1,90; 1,78 (5 s, 15H, COCH_3).



Esquema 14: Síntese do 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-1,1-dipirril-D-galactitol **4**.

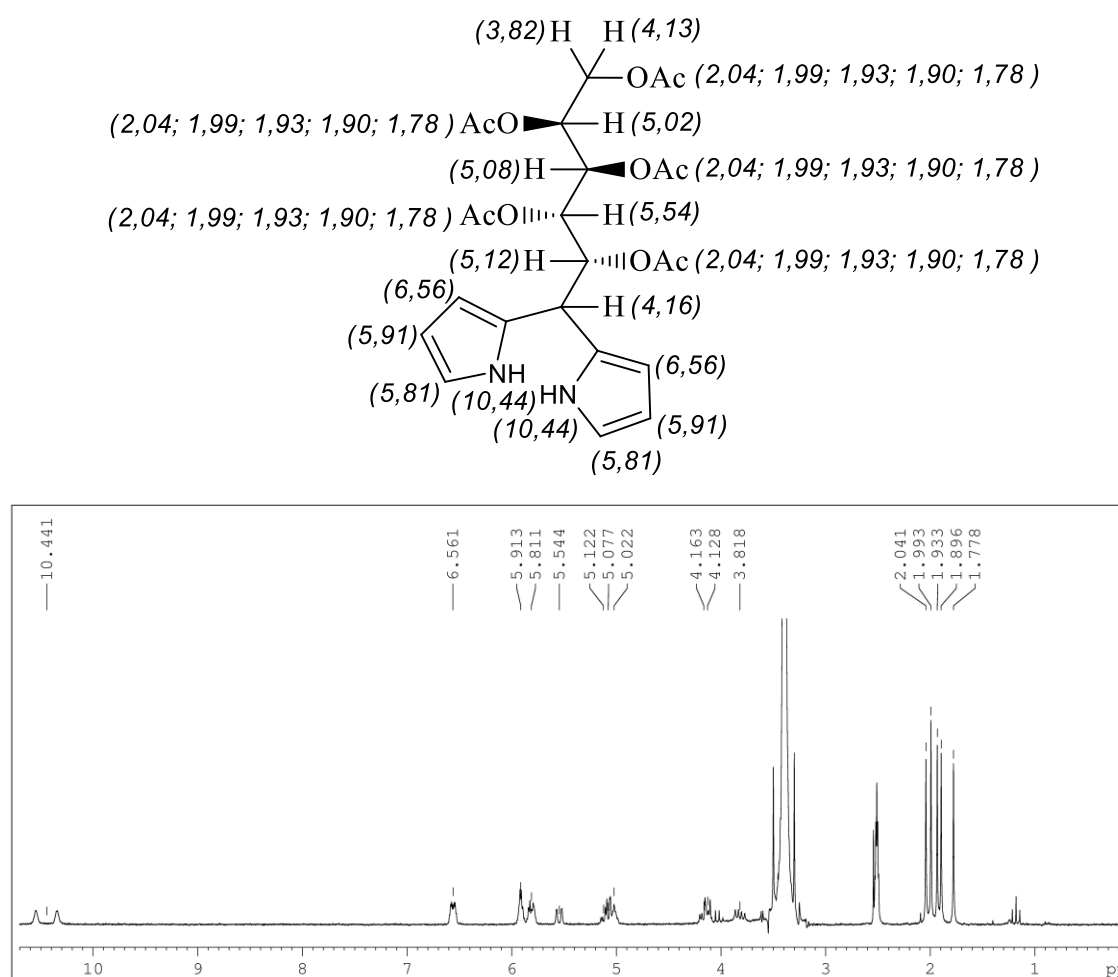


Figura 36: Espectro de RMN ^1H a 30°C (DMSO- d_6 – 200,1 MHz) do 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-1,1-dipirril-D-galactitol **4**, calibrado em 2,51 (DMSO- d_6) e molécula com atribuições.

Anexo 4: 5,15-[bis(fenil)]-10,20-[bis(1-desoxi)-2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-galactitol]porfirina (**5**)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 29 mL de CH₂Cl₂ a 1,45 g (2,86 mmol) do composto **4**, 232 µL (0,34 mmol) de solução de BF₃OEt₂ em diclorometano (26:180) e gotejado, lentamente, 290 µL (2,84 mmol) de benzaldeído **35**. A mistura resultante foi mantida em refluxo, sob agitação magnética, a 60°C por 30 minutos. Após resfriamento do meio reacional até temperatura ambiente, foi adicionado 32 µL (0,23 mmol) de trietilamina e 0,68 g (3,01 mmol) de DDQ. A mistura foi mantida sob agitação magnética a TA por 3 horas. Decorrido o tempo de oxidação, a reação foi interrompida removendo-se o solvente a pressão reduzida. O produto foi purificado em coluna de alumina, utilizando diclorometano como eluente e aumentando a polaridade posteriormente com acetato de etila até a FM diclorometano: acetato de etila 10:1. A coluna foi monitorada por CCD, utilizando como fase móvel acetato de etila:hexano 1:1. A cristalização do produto foi realizada em ciclohexano a quente, a porfirina **5** foi obtida com um rendimento de 12%.

RMN ¹H a 70°C (DMSO-d₆ 400,1 MHz) δ (ppm): 9,82 (d, J=75,2 Hz, 4H, β-pirrol); 8,92 (s, 4H, β'-pirrol); 8,53 (d, J=4,3 Hz, 2H, H1); 8,22 (s, 4H, o-Ph); 7,89 (m, 6H, m/p-Ph); 6,23 (s, 2H, H2); 5,70 (s, 2H, H3); 5,40 (m, 2H, H4); 4,12 (dd, J=4,8-11,7 Hz, 2H, H5a); 3,84 (dd, J=6,9-11,7 Hz, 2H, H5b); 2,27 (s, 6H) 1,81 (s, 6H) 1,62 (b, 18H) (COCH₃); -2,92 (s, 2H, NH).

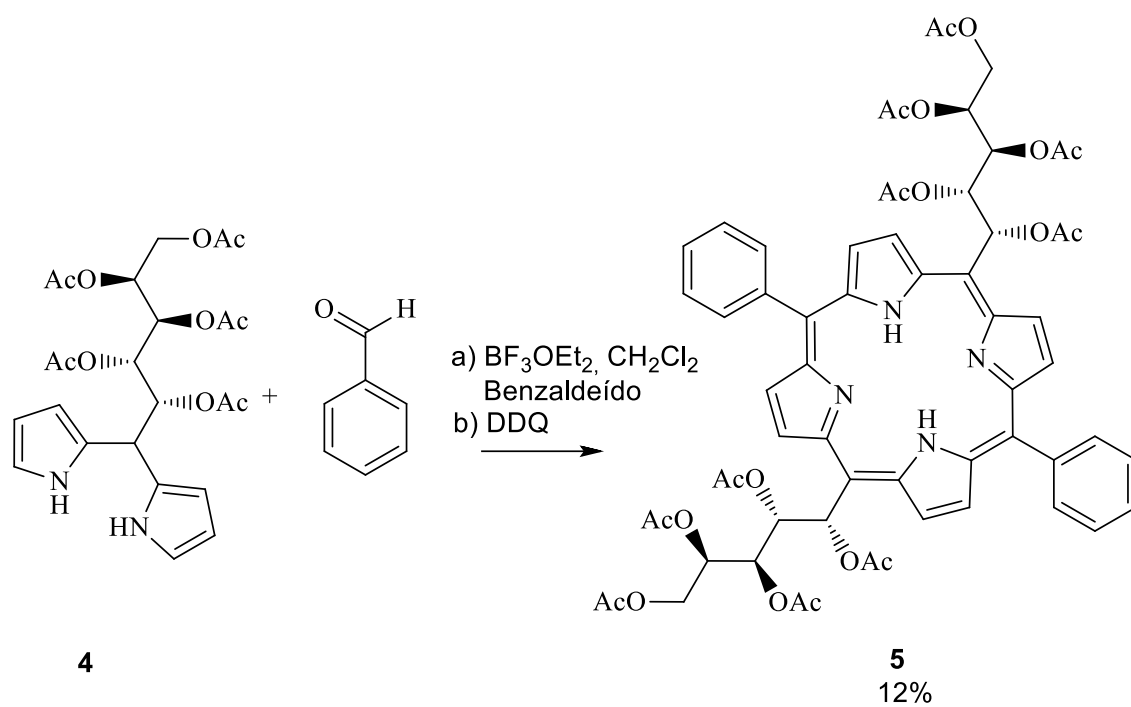
RMN ¹³C a 70°C (DMSO-d₆ 100,63 MHz) δ (ppm): 169,6; 169,3; 169,1; 168,8; 168,3 (5C, C=O); 133,8 (6C, o/p-Ph); 131,3 (4C, β'-pirrol); 127,9 (4C, β-pirrol); 126,5 (4C, m-Ph); 73,6 (2C, C1); 72,8 (2C, C2); 68,9 (2C, C3); 67,5 (2C, C4); 61,5 (2C, C5); 20,5; 20,2; 19,9; 19,7; 17,3 (5C, CH₃).

Espectrometria de massas (*m/z* [MH⁺])

Massa esperada: 1183,403565

Massa obtida MALDI-TOF: 1183,587 – Erro 15,50 ppm

Massa obtida Q-TOF: 1183,4080 – Erro 0,37 ppm



Esquema 15: Síntese de 5,15-[bis(fenil)]-10,20-[bis(1-desoxi)-2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-galactitol]porfirina **5**

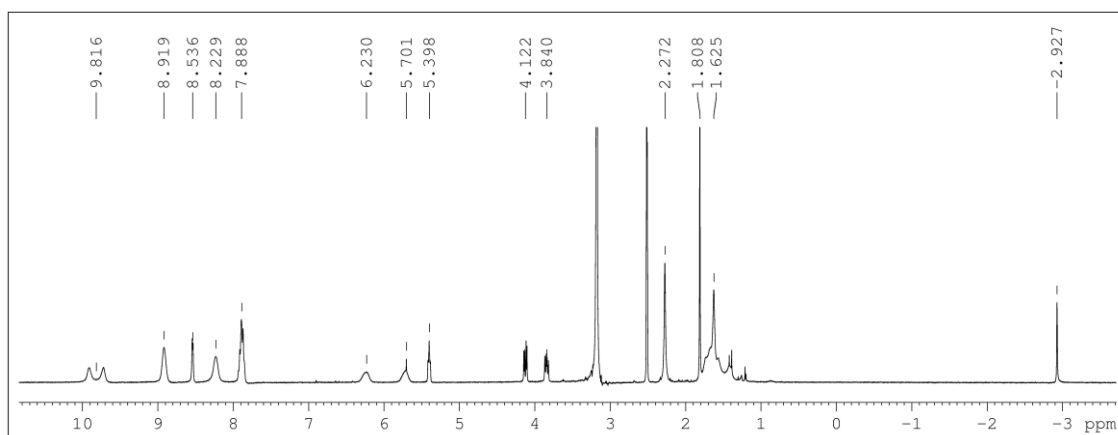
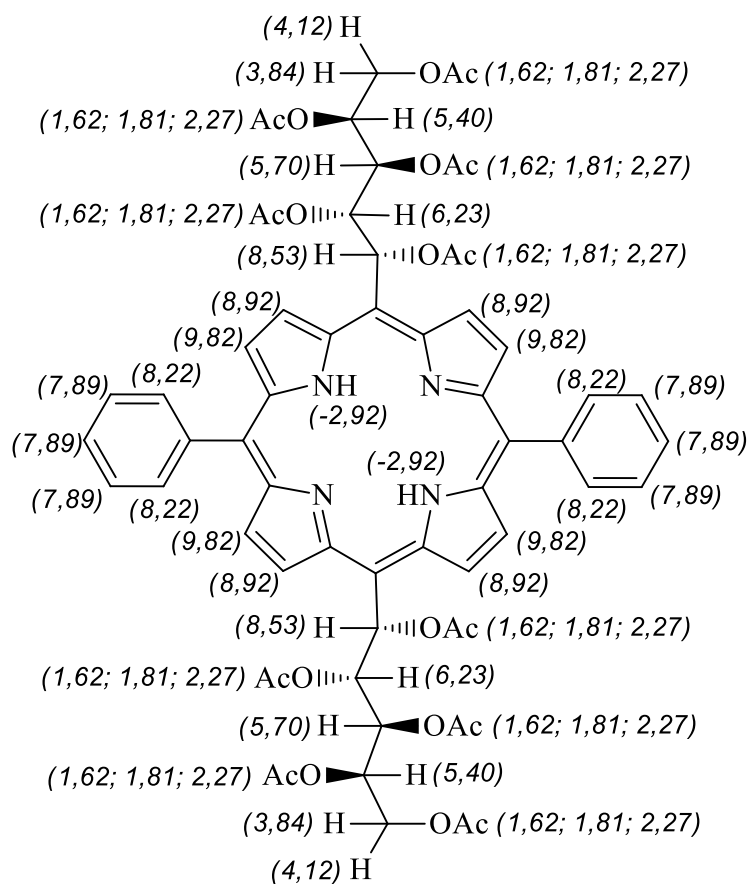


Figura 37: Espectro de RMN ¹H a 70°C (DMSO-d₆ – 400,1 MHz) da porfina **5**, calibrado em 2,51 (DMSO-d₆) e molécula com atribuições.

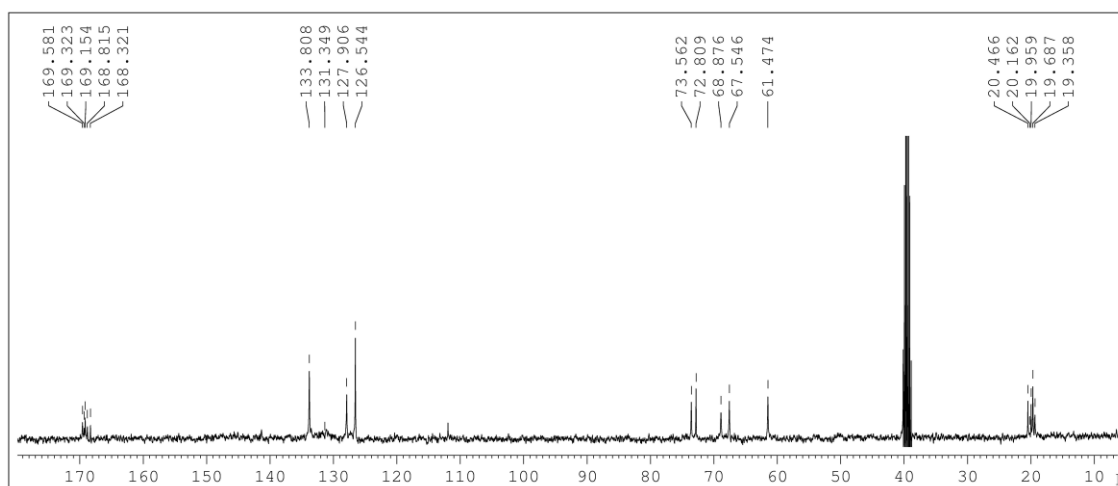
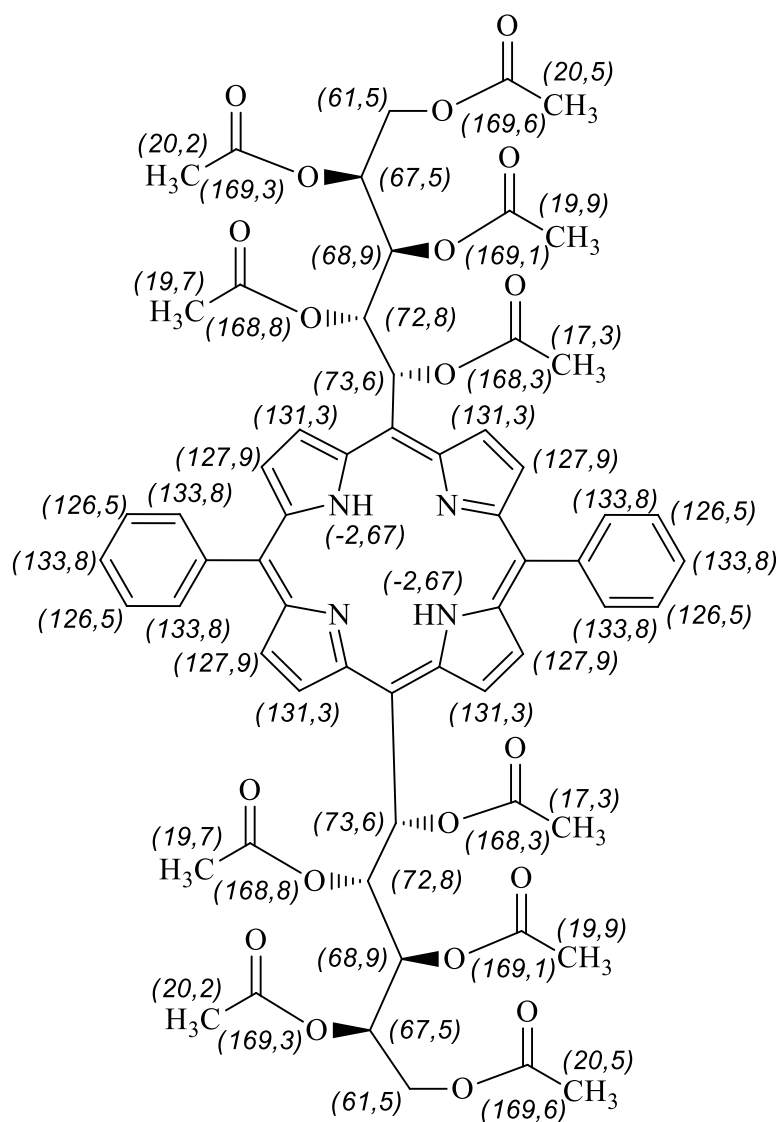


Figura 38: Espectro de RMN ^{13}C a 70°C (DMSO- d_6 – 100,63 MHz) da porfina **5**, calibrado em 39,50 (DMSO- d_6) e molécula com atribuições.

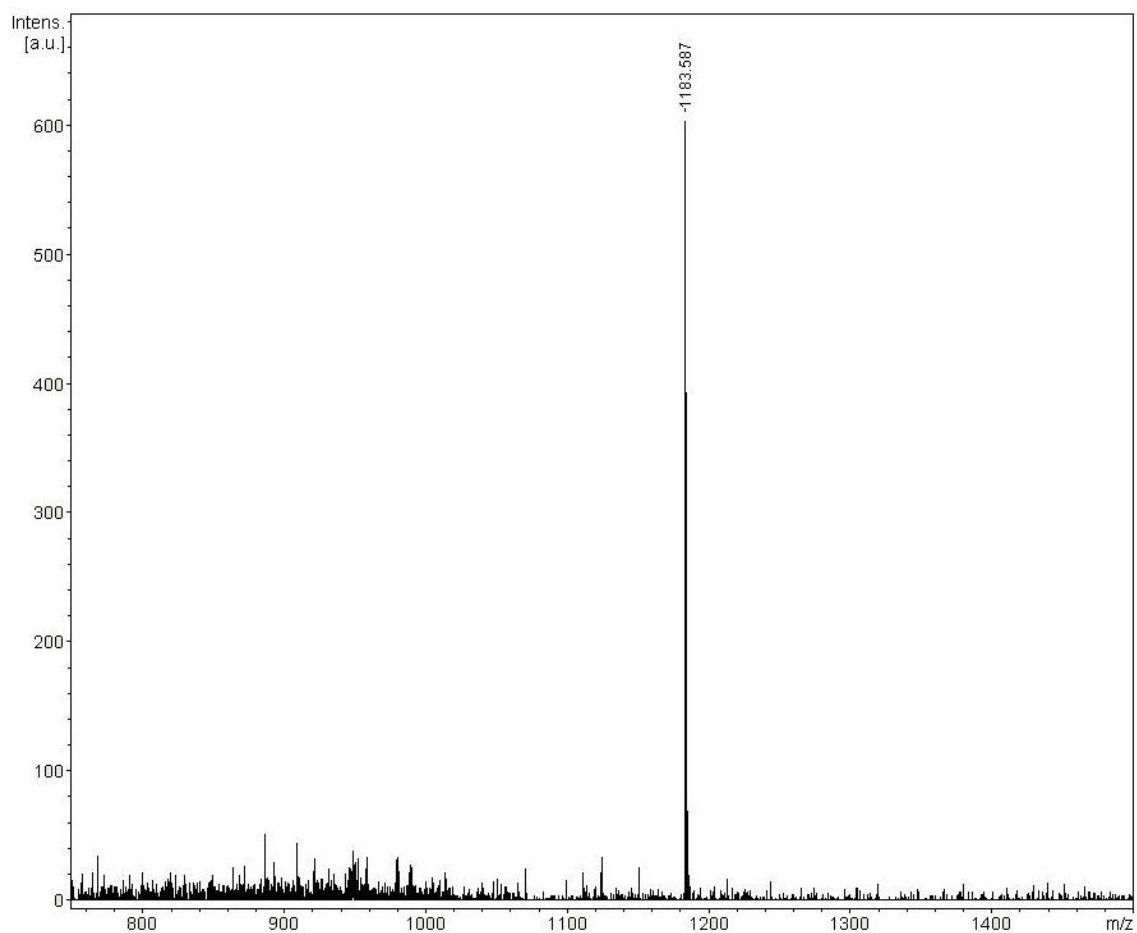


Figura 39: Espectro de massas MALDI-TOF da porfirina 5.

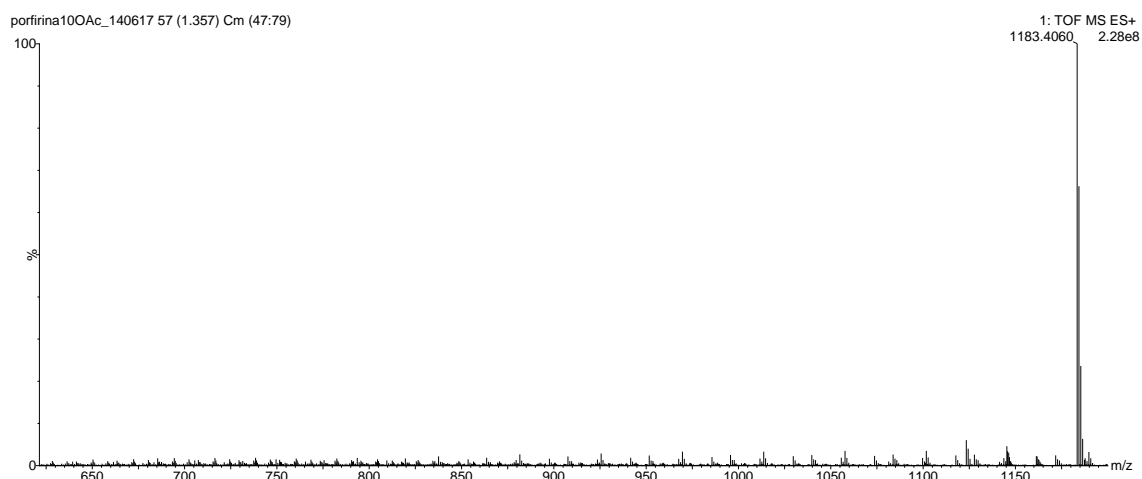
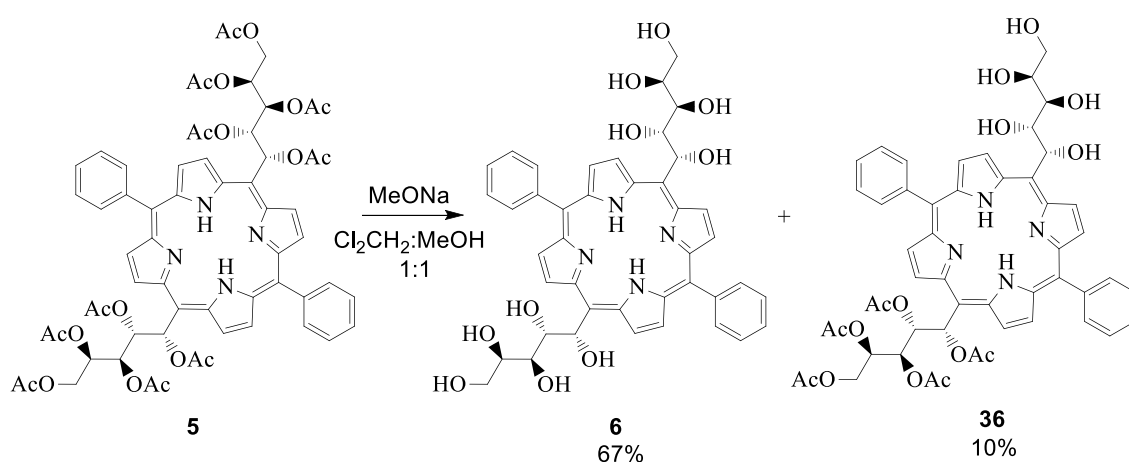


Figura 40: Espectro de massas Q-TOF da porfirina 5.

Anexo 5: Reação de desacetilação química número 3 (Tabela 1)

Em balão de fundo redondo, foi adicionado a 50 mg (0,042 mmol) da porfirina **5**, 5 mL de diclorometano e 5 mL de metanol anidro, além de 1,26 mL (0,63 mmol) de uma solução metanólica 0,5 mol/L de metóxido de sódio previamente preparada pela adição de sódio metálico em metanol anidro. A reação foi mantida sob agitação, a -10°C por 30 a 160 minutos, monitorada por CCD. Ao término da reação, o meio reacional foi neutralizado com auxílio de resina de catiônica, previamente preparada, até pH próximo a 7, filtrado e o solvente evaporado com auxílio de rota-evaporador. A purificação dos produtos foi realizada por coluna de sílica, utilizando como FM acetato de etila:metanol:água (13:2:1).

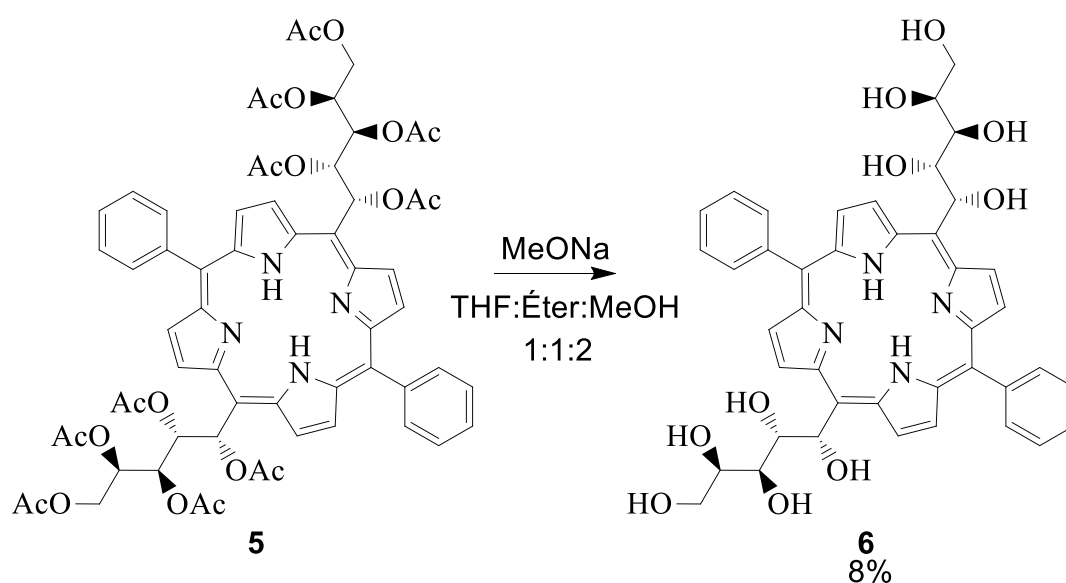
Esta síntese promoveu a formação de duas moléculas com diferentes graus de acetilação, passíveis de purificação. O rendimento do composto **6** foi de 28% enquanto o rendimento do composto penta-acetilado **36** foi de 10%.



Esquema 16: Estratégia de síntese química de galactoporfirina totalmente desacetilada utilizando metanol e diclorometano como solvente.

Anexo 6: Reação de desacetilação química número 13 (Tabela 1).

Em balão de fundo redondo, foi adicionado à 50 mg (0,042 mmol) da porfirina **5**, 2,5 mL de THF, 2,5 mL de éter etílico e 5 mL de metanol anidro, além de 1,26 mL (0,63 mmol) de uma solução metanólica de metóxido de sódio previamente preparada. A solução de metóxido de sódio foi adicionada ao meio reacional em 12 porções de 105 µL adicionados a cada 5 minutos de reação. A reação foi mantida sob agitação, em TA por 60 minutos e monitorada por CCD. Ao término da reação, o meio reacional foi neutralizado com auxílio de resina de catiônica em forma hidrogeniônica, até pH próximo a 7, filtrado e o solvente foi evaporado com auxílio de rota-evaporador. A purificação do produto foi realizada por coluna de sílica, utilizando como FM acetato de etila: metanol: água (13:2:1). Após a coluna, o produto foi cristalizado pela adição ciclohexano à molécula solubilizada em metanol. Os cristais foram filtrados e secos a TA. A porfirina **6** foi obtida com um rendimento de 8%.



Esquema 17: Estratégia de síntese química de galactoporfirina totalmente desacetilada utilizando metanol, THF e éter etílico como solvente.

Anexo 7: Metodologia para as tentativas de desacetilação química 18 e 19 (Tabela 1).

Condição 18

Metalação da porfirina: Em tubo selado, foi adicionado 5 mg de glicoporfirina, 4 mg de acetato de cobre, 0,5 mL de diclorometano e 20 µL de ácido acético glacial. A reação ocorreu durante 20 minutos, a temperatura ambiente, sob agitação magnética. A formação da porfirina metalada foi verificada por CCD, observando uma banda de coloração rosa.

Desproteção da porfirina metalada: Foi adicionado ao meio reacional da metalação, 1 mL de metanol anidro e 0,8 mL de solução de MeONa 0,5 mol/L. A reação foi mantida a TA, por 15 minutos sob agitação magnética. Não houve a formação de produto desacetilado.

Condição 19

Metalação da porfirina: Em tubo selado, foi adicionado 5 mg de glicoporfirina, 5 mg de acetato de zinco, 0,5 mL de diclorometano e 20 µL de ácido acético glacial. A reação ocorreu durante 20 minutos, a temperatura ambiente, sob agitação magnética. A formação da porfirina metalada foi verificada por CCD, observando uma banda de coloração roxa.

Desproteção da porfirina metalada: Foi adicionado ao meio reacional da metalação, 1 mL de metanol anidro e 0,8 mL de solução de MeONa 0,5 mol/L. A reação foi mantida a TA, por 15 minutos sob agitação magnética. Não houve a formação de produto desacetilado.

Anexo 8: Reação de desacetilação química

Em balão de fundo redondo, foi adicionado a 50 mg (0,042 mmol) da porfirina **5**, 5 mL de diclorometano e 5 mL de metanol anidro, além de 1,26 mL (0,63 mmol) de uma solução metanólica 0,5 mol/L de metóxido de sódio previamente preparada pela adição de sódio metálico em metanol anidro. A reação foi mantida sob agitação, a -10°C por 30 a 160 minutos, monitorada por CCD. Ao término da reação, o meio reacional foi neutralizado com auxílio de resina de catiônica, previamente preparada, até pH próximo a 7, filtrado e o solvente foi evaporado com auxílio de rota-evaporador. A purificação dos produtos foi realizada por coluna de sílica utilizando como FM acetato de etila: metanol: água (13:2:1). Foi utilizada sílica ativada e o material a ser cromatografado foi incorporado à uma pequena quantidade de sílica “polvereto” para melhorar a eficiência da separação por coluna.

O rendimento do composto **6** foi de 67%. A cristalização se deu pela adição de ciclohexano à molécula solubilizada em metanol. Os cristais foram então filtrados e secos a TA.

RMN ^1H a 70°C (DMSO- d_6 400,1 MHz) δ (ppm): 9,99 (d, $J=4,8$ Hz, 4H, β -pirrol); 8,69 (d, $J=4,9$ Hz, 4H, β' -pirrol); 8,16 (m, 4H, o-Ph); 7,84 (m, 6H, m/p-Ph); 7,64 (s, 2H, H1); 6,45 (d, $J=3,3$ Hz, 2H, OH1); 4,85 (d, $J=6,9$ Hz, 2H, OH2); 4,46 (b, 2H, H2); 4,41 (b, 2H, OH3); 4,32 (b, 2H, OH5); 4,06 (b, 2H, H3); 3,96 (b, 2H, H4); 3,52 (b, 6H OH4, H5a, H5b); -2,67(s, 2H, NH).

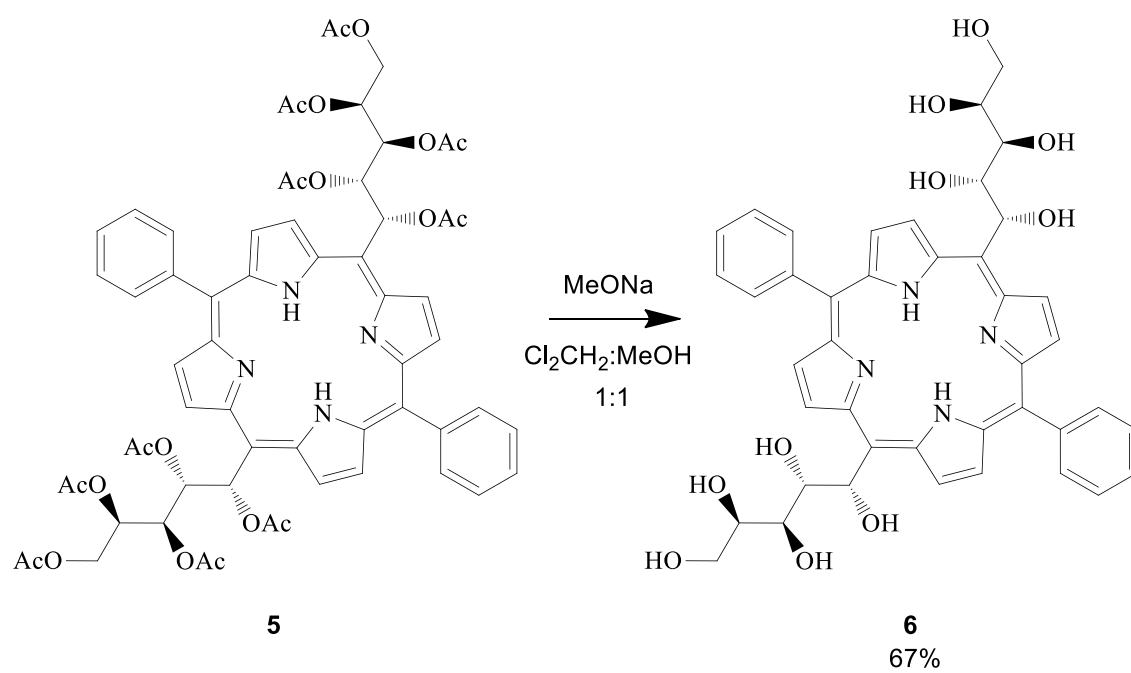
RMN ^{13}C a 70°C (DMSO- d_6 100,63 Mhz) δ (ppm): 133,7 (4C, o-Ph); 130,6 (4C, β -pirrol); 130,2 (4C, β' -pirrol); 127,6 (2C, p-Ph); 126,5 (4C, m-Ph); 78,3 (2C, C2); 73,6 (2C, C1); 71,3 (2C, C3); 70,5 (2C, C4); 63,3 (2C, C5).

Espectrometria de massas (m/z [MH^+])

Massa esperada ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 763,297922

Massa obtida MALDI-TOF ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 763,967 – Erro 87,66 ppm

Massa obtida Q-TOF($[\text{M}+\text{H}]^+$) 763,2976 – Erro 0,04 ppm



Esquema 18: Síntese da porfirina **6** via desacetilação química.

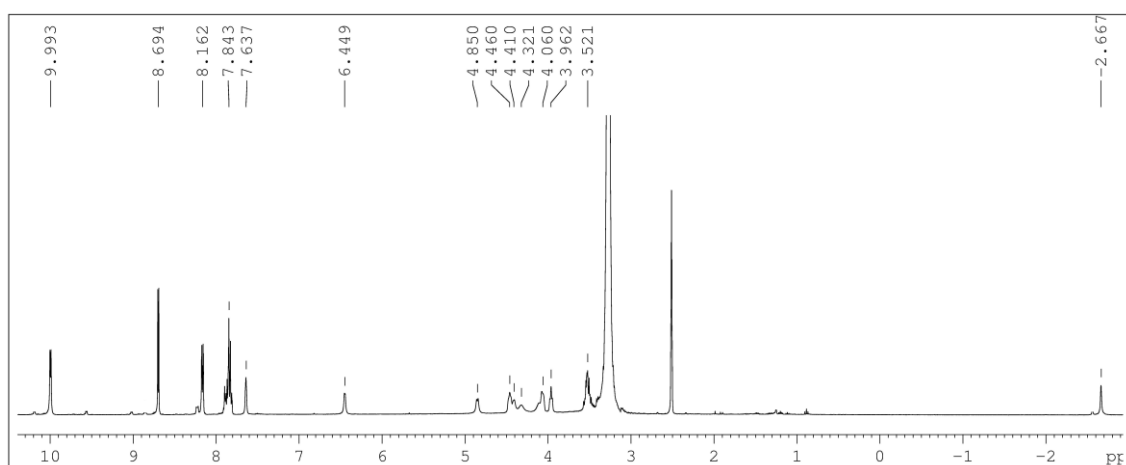
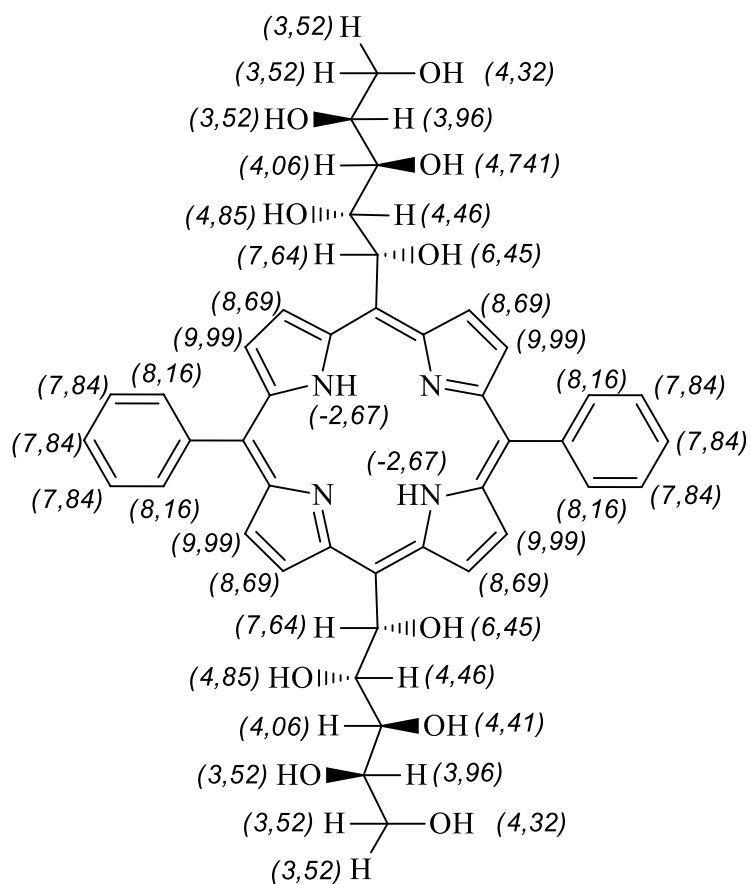


Figura 41: Espectro de RMN ^1H a 70°C (DMSO- d_6 – 400,1 MHz) da porfirina **6**, calibrado em 2,51 (DMSO- d_6) e molécula com atribuições.

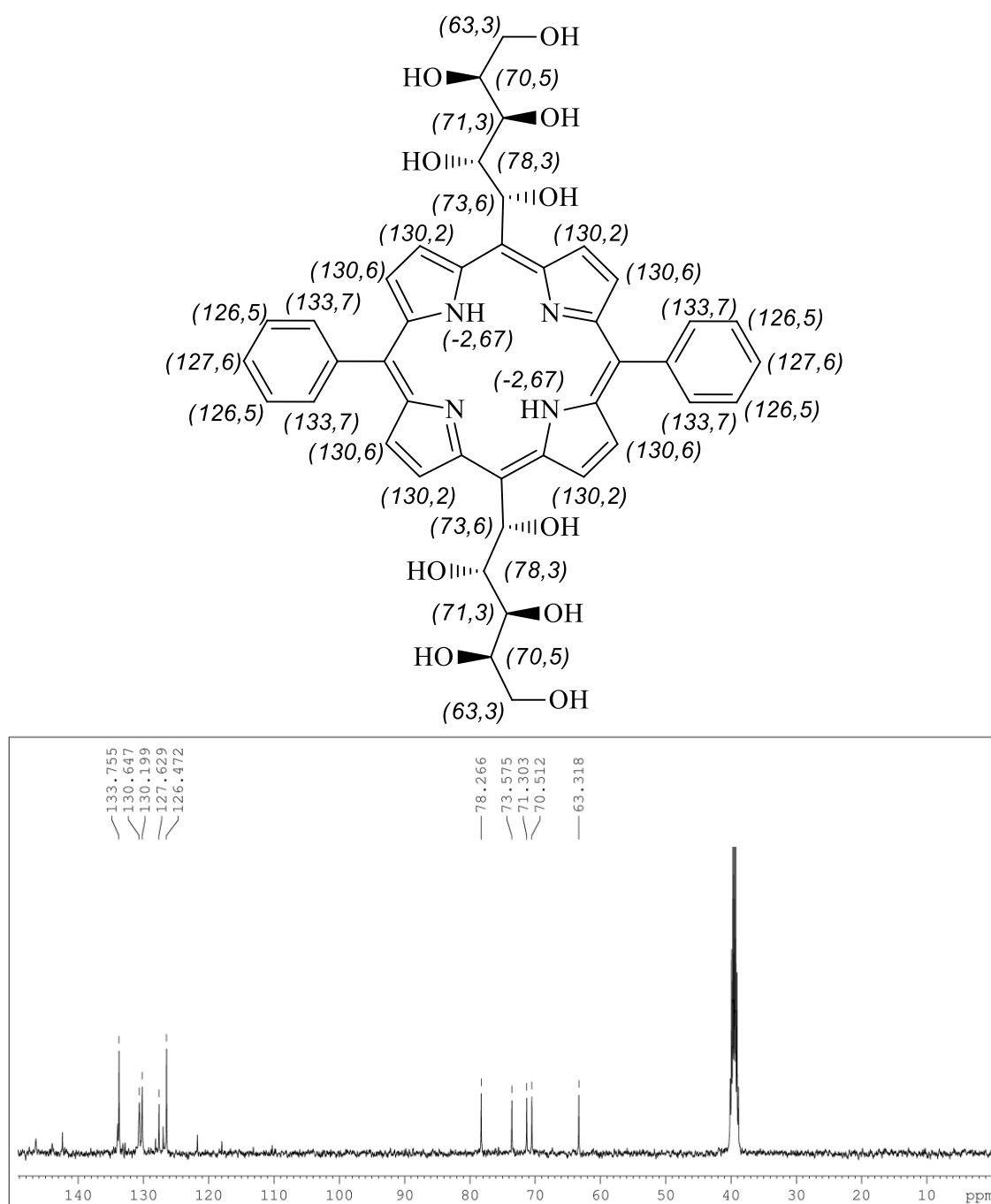


Figura 42: Espectro de RMN ^{13}C a 70°C (DMSO- d_6 – 100,63 MHz) da porfirina **6**, calibrado em 39,50 (DMSO- d_6) e molécula com atribuições.

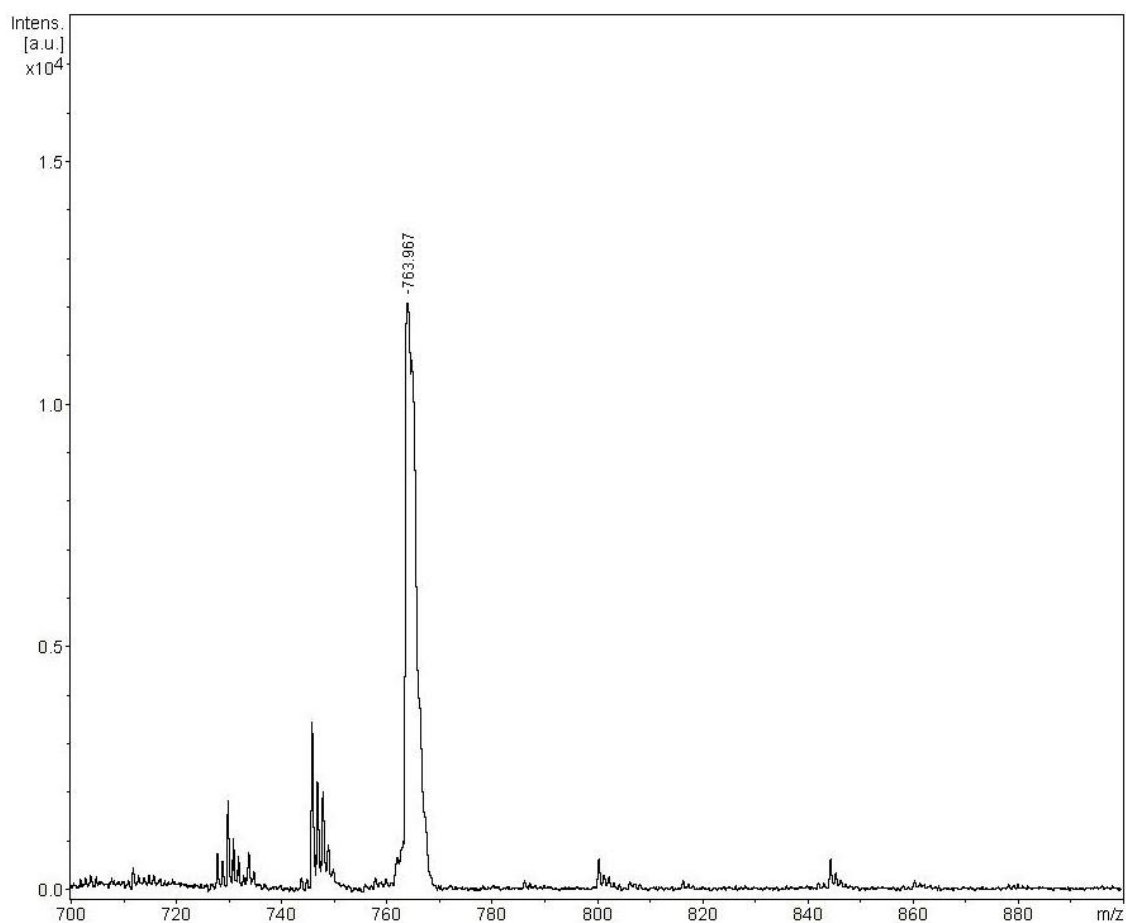


Figura 43: Espectro de massas MALDI-TOF da porfirina 6.

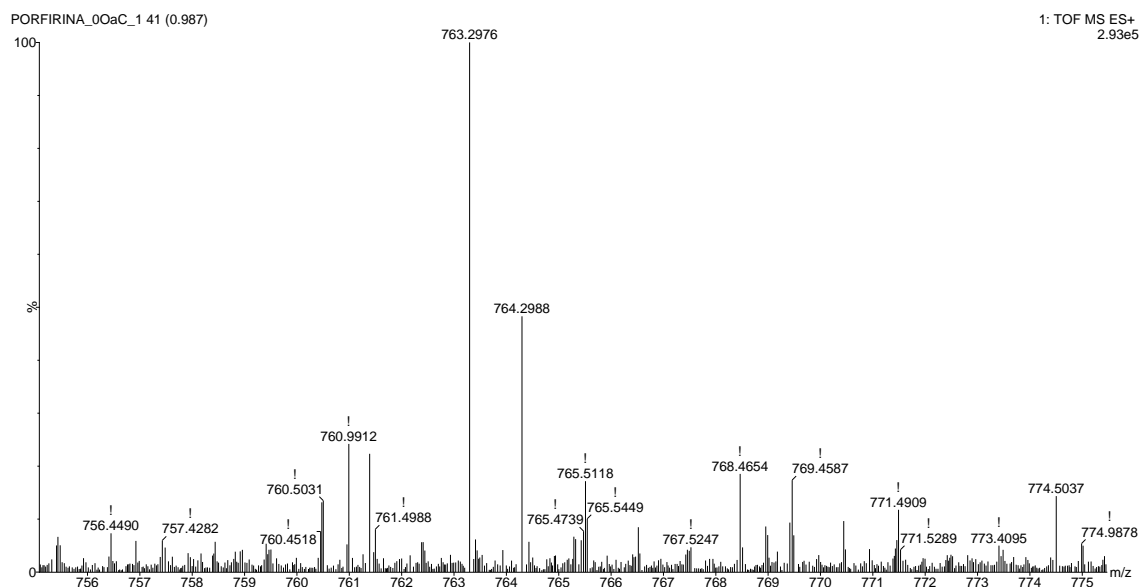


Figura 44: Espectro de massas Q-TOF da porfirina 6.

Anexo 9: Reação de desacetilação enzimática

A reação foi realizada em *vial*, onde foi pesado 10 mg (8,45 μmol) da porfirina **5** e 10 mg da enzima NOVOZYM 435 (1:1 m/m), foi então adicionado 1,0 mL (24,75 mmol) de metanol, 1,0 mL de THF e 1,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0. A reação foi mantida por 24 horas em *shaker* a 55 rpm a 40°C. A reação foi interrompida filtrando-se a enzima do meio reacional e evaporando o solvente sob pressão. A purificação se deu pela realização de coluna de alumina, utilizando como FM diclorometano e aumentando a polaridade com acetato de etila, até utilizar como FM apenas o acetato de etila.

Espectrometria de massas

Porfirina contendo oito grupamentos O-acetila

Massa esperada ($[M+H]^+$) 1099,381887

Massa obtida MALDI-TOF ($[M+H]^+$) 1099,919 – Erro 48,85 ppm

Massa obtida Q-TOF($[M+H]^+$) 1099,3868 – Erro 0,45 ppm

Porfirina contendo nove grupamentos O-acetila

Massa esperada ($[M+H]^+$) 1141,392452

Massa obtida MALDI-TOF ($[M+H]^+$) 1141,989 – Erro 52,26 ppm

Massa obtida Q-TOF ($[M+H]^+$) 1141,3954 – Erro 0,26 ppm

Massa esperada ($[M+Na]^+$) 1163,374397

Massa obtida Q-TOF($[M+Na]^+$) 1163,3763 – Erro 0,16 ppm

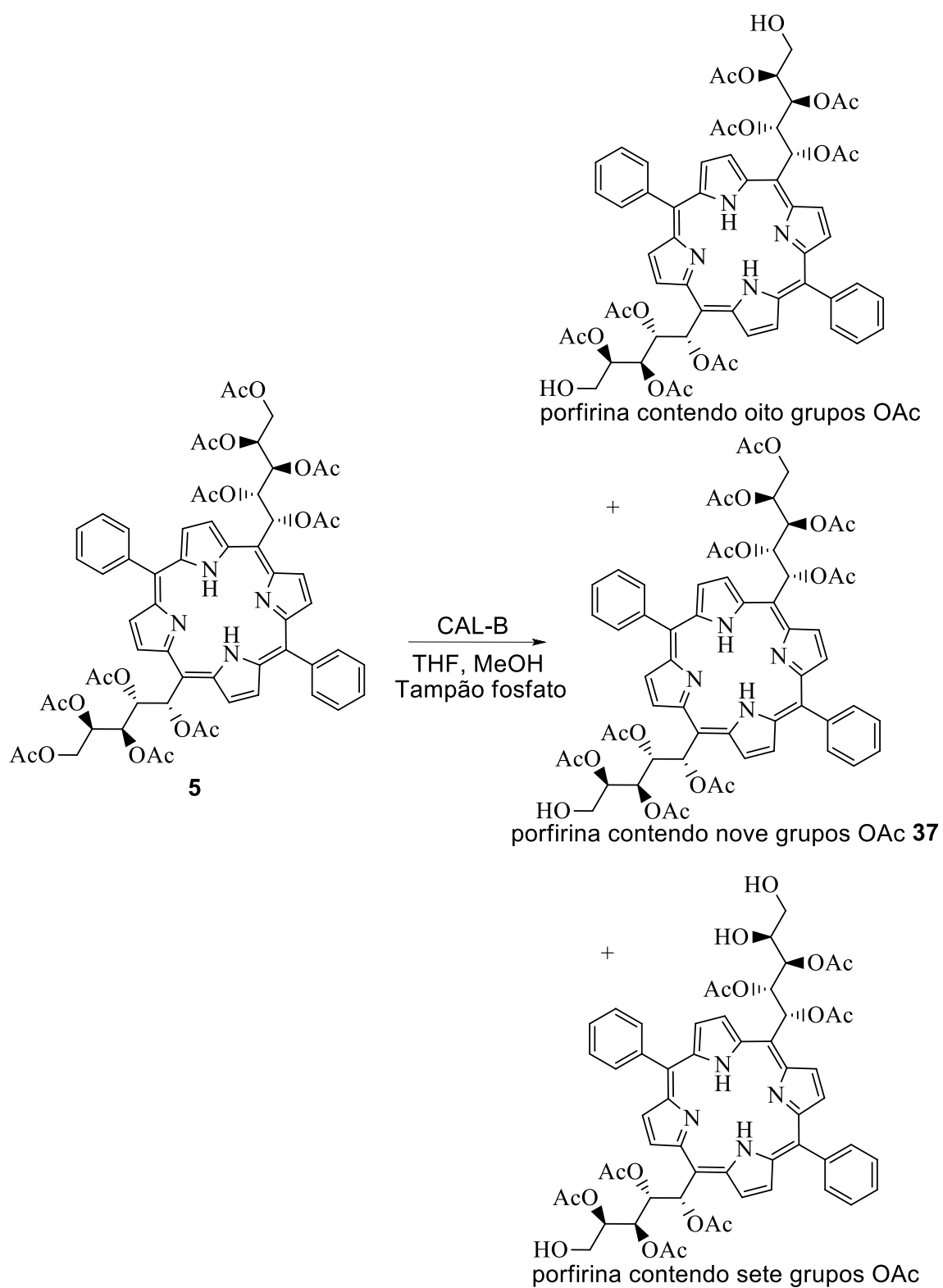
Massa esperada ($[M+K]^+$) 1179,348334

Massa obtida Q-TOF($[M+Na]^+$) 1179,3508 – Erro 0,21 ppm

Porfirina contendo sete grupamentos O-acetila

Massa esperada ($[M+H]^+$) 1057,371323

Massa obtida MALDI-TOF ($[M+H]^+$) 1057,952 – Erro 54,92 ppm



Esquema 19: Reação de desacetilação enzimática.

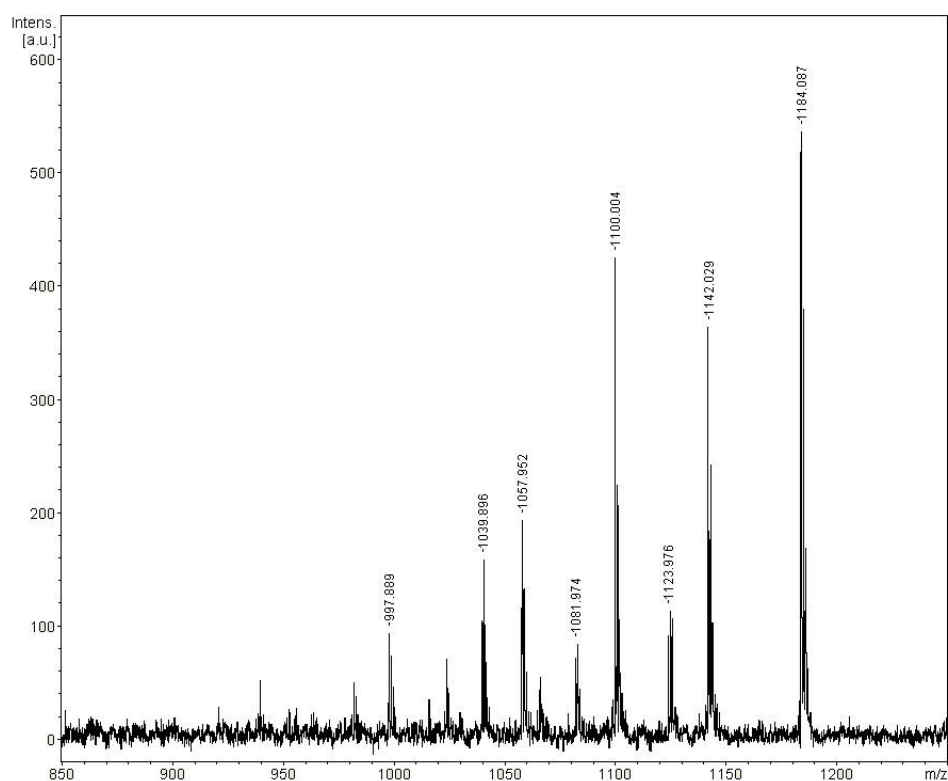


Figura 45: Espectro de massas MALDI-TOF da reação de desacetilação enzimática.

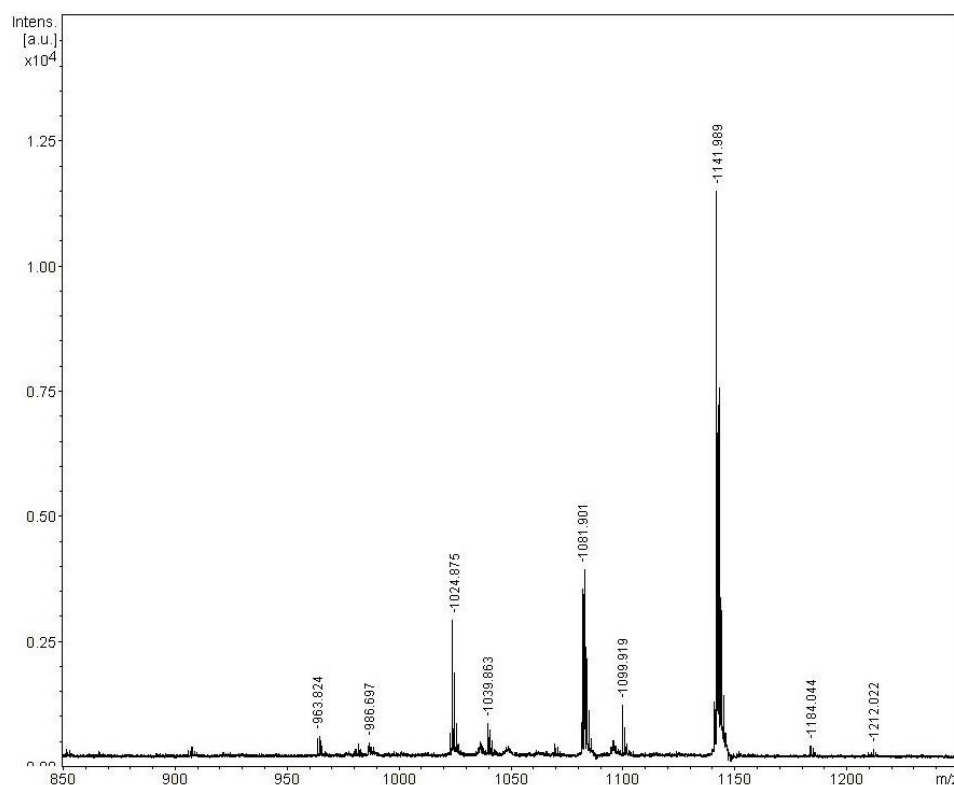


Figura 46: Espectro de massas MALDI-TOF da reação de desacetilação enzimática após purificação, contendo especialmente a porfina contendo 9 grupamentos O-acetila, com uma pequena quantidade de porfina contendo 8 grupamentos O-acetila.

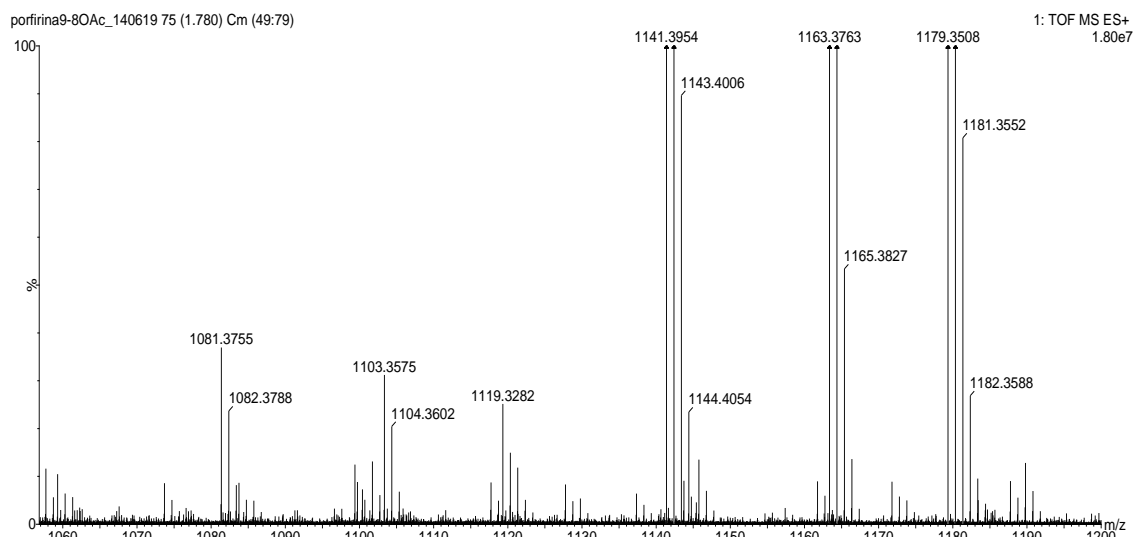


Figura 47: Espectro de massas Q-TOF da reação de desacetilação enzimática após purificação, contendo especialmente a porfirina contendo 9 grupamentos O-acetila, sodiada e potassiada.

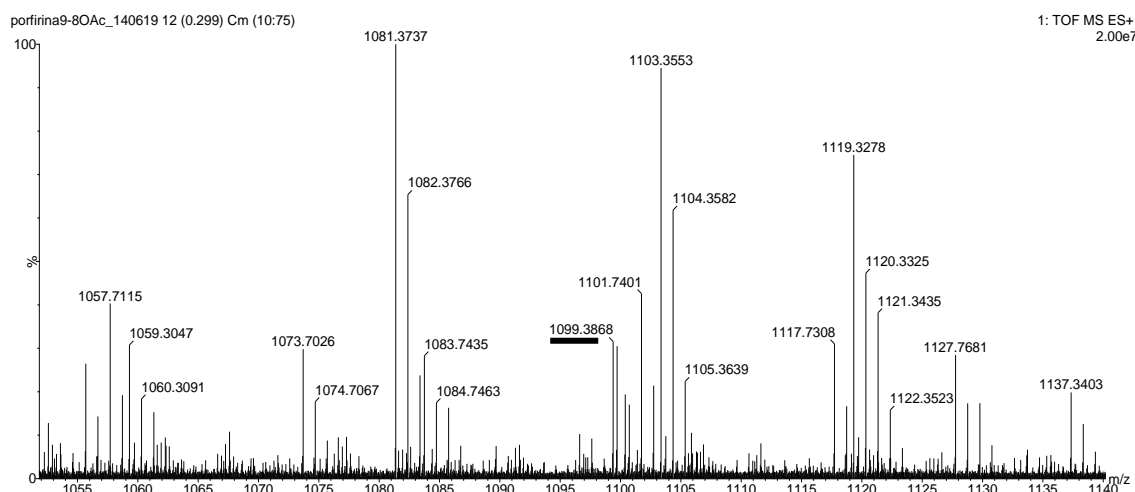


Figura 48: Espectro de massas Q-TOF da reação de desacetilação enzimática após purificação, mostrando a existência de pequena quantidade de porfirina contendo 8 grupamentos O-acetila.

Anexo 10: Reação de acetilação enzimática (obtenção da porfirina **37**)

A reação foi realizada em *vial*, onde foi pesado 10 mg (0,013 mmol) da porfirina **6** e 10 mg da enzima NOVOZYM 435 (1:1 m/m), foi então adicionado 1,50 mL (16,27 mmol) de acetato de vinila como doador de grupamentos O-acetila e 1,50 mL de THF como solvente. A reação foi mantida por 24 horas em *shaker* a 55 rpm a 40°C. A reação foi terminada filtrando a enzima do meio reacional e evaporando o solvente sob pressão. A purificação se deu pela realização de CCD preparativa seguida por coluna cromatográfica, ambas utilizando como FM acetato de etila:metanol:água (13:2:1) sendo a porfirina **37** obtida com rendimento de 53%. A cristalização foi feita solubilizando o material em metanol e adicionando ciclohexano, conseguindo um rendimento de 13% após cristalização.

RMN ^1H a 70°C (DMSO- d_6 400,1 MHz) δ (ppm): 10,01 (d, $J=4,7$ Hz, 4H, β -pirrol); 8,70 (d, $J=4,9$ Hz, 4H, β' -pirrol); 8,18 (d, $J=6,2$ Hz, 4H, o-Ph); 7,85 (7,88-7,82, m, 6H, m/p-Ph); 7,65 (s, 2H, H1); 6,51 (d, $J=3,6$ Hz, 2H, OH1); 4,92 (d, $J=7,4$ Hz, 2H, OH2); 4,76 (d, $J=7,2$ Hz, 2H, OH3); 4,49 (b, 2H, OH4); 4,47 (d, $J=6,0$ Hz, 2H, H2); 4,15 (b, 2H, H5a); 4,13 (b, 2H, H5b); 4,11 (b, 2H, H4); 4,00 (t, $J=7,4$ e 14,7 Hz, 2H, H3); 1,92 (s, 6H, CH₃); -2,66 (s, 2H, NH).

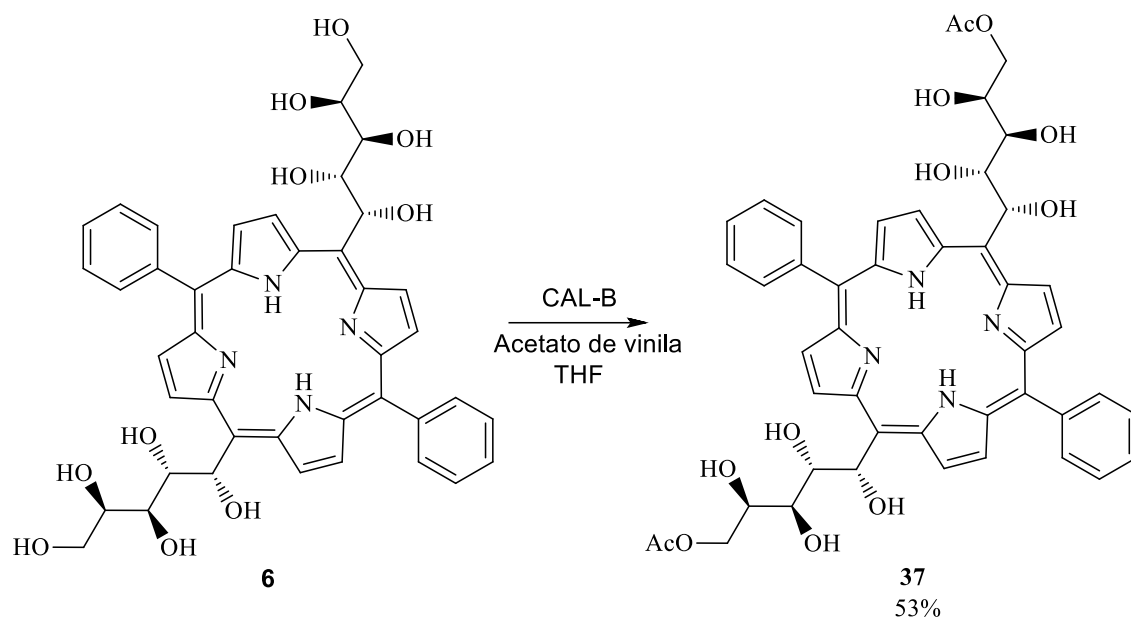
RMN ^{13}C a 70°C (DMSO- d_6 100,63 MHz) δ (ppm): 169,9 (2C, C=O); 133,7 (4C, o-Ph); 130,6 (4C, β -pirrol); 130,1 (4C, β' -pirrol); 127,5 (2H, p-Ph); 126,4 (4C, m-Ph); 78,0 (2C, C2); 73,3 (2C, C1); 70,9 (2C, C3); 67,6 (2C, C5); 65,7 (2C, C4); 20,3 (6C, CH₃)

Espectrometria de massas (m/z [MH⁺])

Massa esperada ([M+H]⁺) 847,319051

Massa obtida MALDI-TOF ([M+H]⁺) 847,807 – Erro 57,59 ppm

Massa obtida Q-TOF([M+H]⁺) 847,3180 – Erro 0,12 ppm



Esquema 20: Síntese da porfirina **37** via acetilação enzimática.

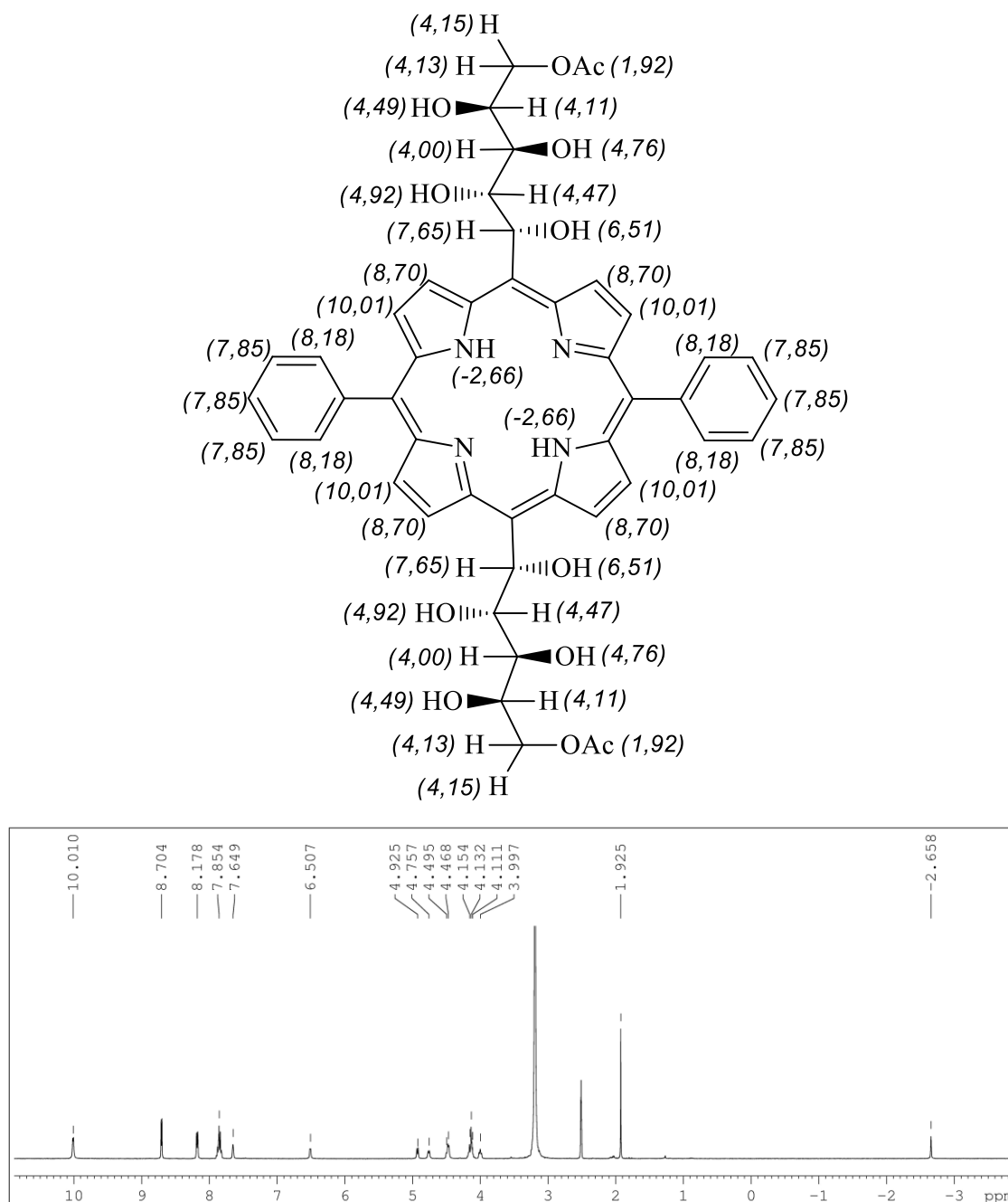


Figura 49: Espectro de RMN ^1H a 70°C (DMSO- d_6 – 400,1 MHz) da porfirina **37**, calibrado em 2,51 (DMSO- d_6) e molécula com atribuições.

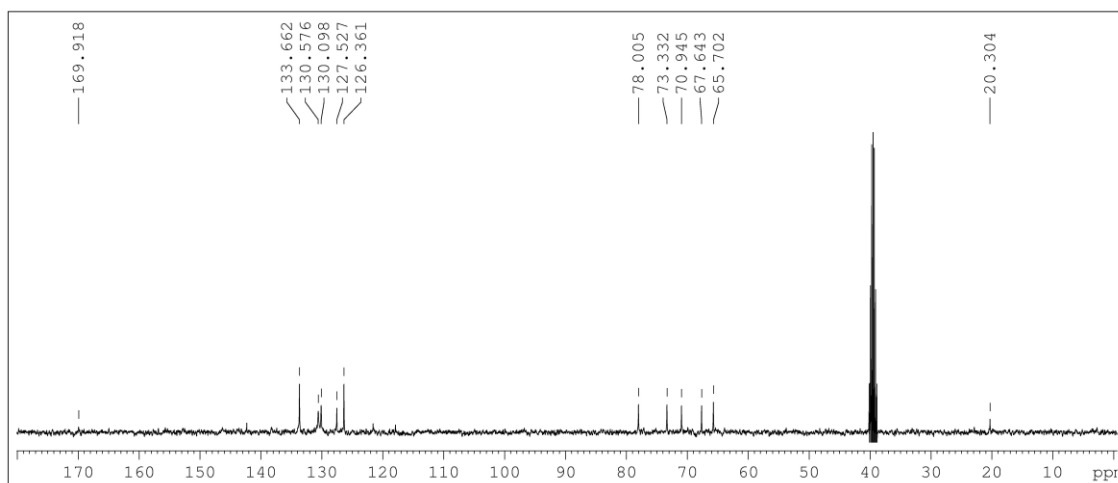
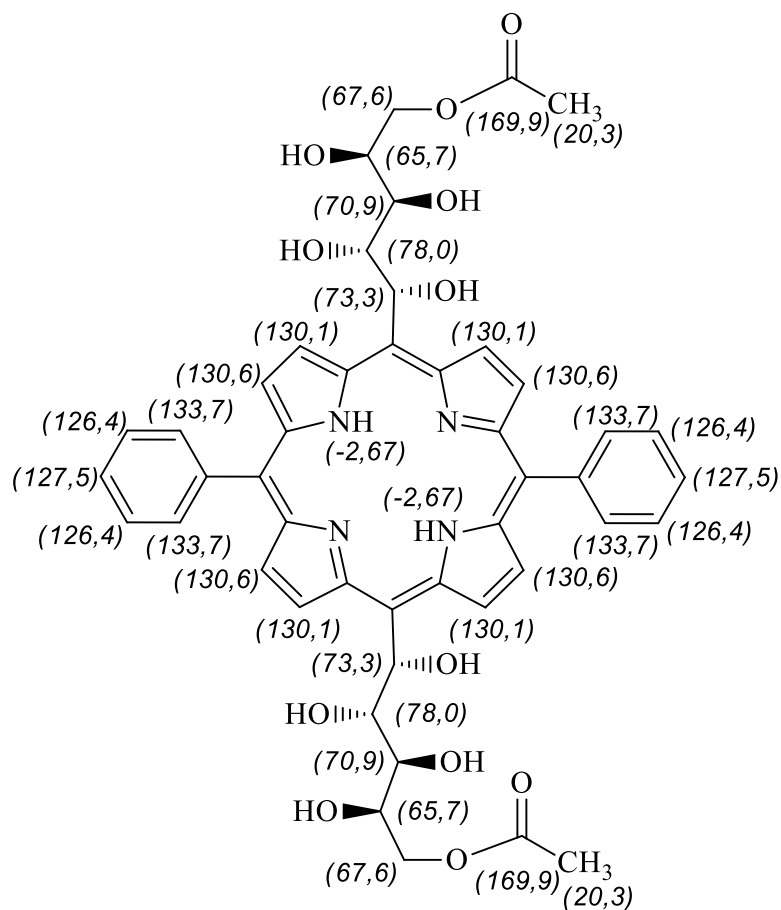


Figura 50: Espectro de RMN ^{13}C a 70°C (DMSO- d_6 – 100,63 MHz) da porfirina **37**, calibrado em 39,50 (DMSO- d_6) e molécula com atribuições.

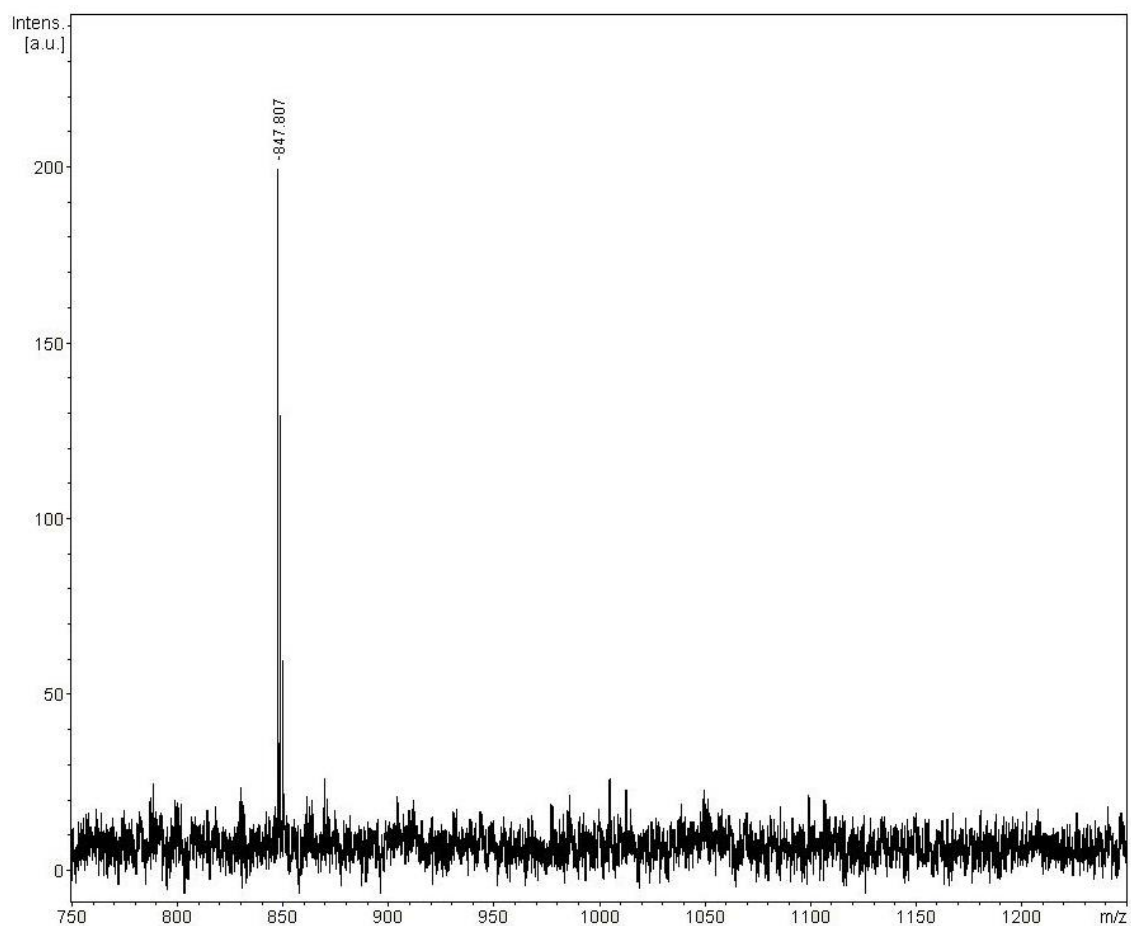


Figura 51: Espectro de massas MALDI-TOF da porfirina 37.

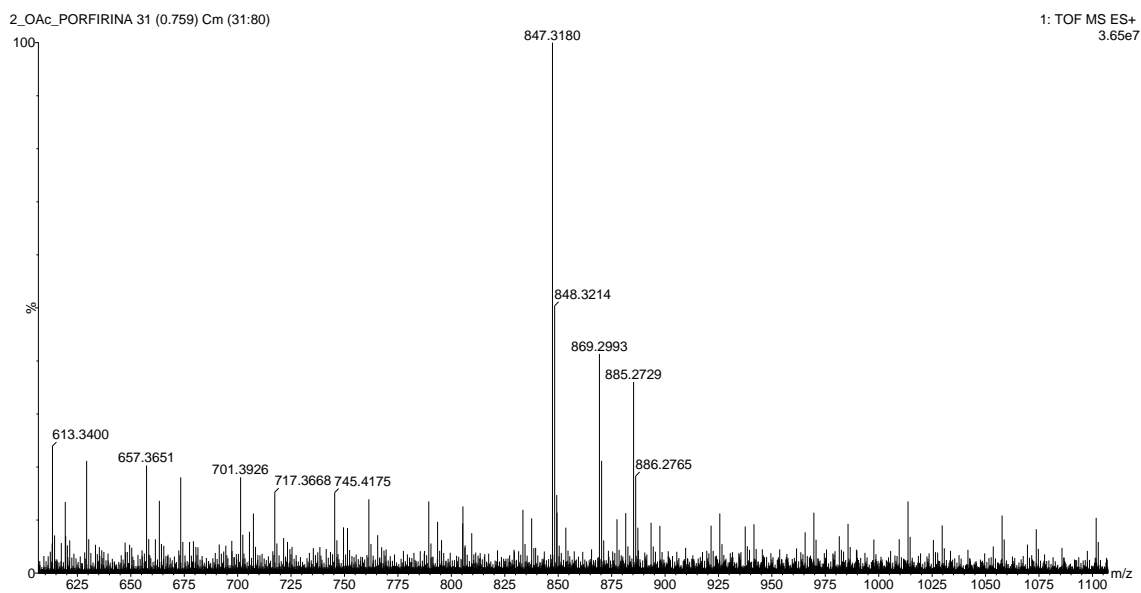


Figura 52: Espectro de massas Q-TOF da porfirina 37.